

II

(Atti non legislativi)

REGOLAMENTI

REGOLAMENTO (UE) 2016/266 DELLA COMMISSIONE

del 7 dicembre 2015

recante modifica, ai fini dell'adeguamento al progresso tecnico, del regolamento (CE) n. 440/2008 che istituisce dei metodi di prova ai sensi del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH)

(Testo rilevante ai fini del SEE)

LA COMMISSIONE EUROPEA,

visto il trattato sul funzionamento dell'Unione europea,

visto il regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 18 dicembre 2006, concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'Agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE⁽¹⁾, in particolare l'articolo 13, paragrafo 2,

considerando quanto segue:

- (1) Il regolamento (CE) n. 440/2008 della Commissione⁽²⁾ istituisce i metodi di prova per determinare le proprietà fisico-chimiche, la tossicità e l'ecotossicità delle sostanze chimiche applicabili ai fini del regolamento (CE) n. 1907/2006.
- (2) È necessario aggiornare il regolamento (CE) n. 440/2008 per includervi in via prioritaria nuovi e aggiornati metodi di prova adottati di recente dall'OCSE, per tener conto del progresso tecnico e ridurre il numero di animali usati a scopi di sperimentazione, conformemente alla direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio⁽³⁾. Le parti interessate sono state consultate in merito alla proposta.
- (3) L'adeguamento contiene 20 metodi di prova, ossia un nuovo metodo per la determinazione di una proprietà fisico-chimica, undici nuovi metodi di prova e tre metodi di prova aggiornati per la valutazione dell'ecotossicità, e cinque nuovi metodi di prova per valutare il destino e il comportamento ambientale.
- (4) È opportuno pertanto modificare di conseguenza il regolamento (CE) n. 440/2008.
- (5) Le misure di cui al presente regolamento sono conformi al parere del comitato di cui all'articolo 133 del regolamento (CE) n. 1907/2006,

⁽¹⁾ GU L 396 del 30.12.2006, pag. 1.

⁽²⁾ Regolamento (CE) n. 440/2008 della Commissione, del 30 maggio 2008, che istituisce dei metodi di prova ai sensi del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) (GU L 142 del 31.5.2008, pag. 1).

⁽³⁾ Direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (GU L 276 del 20.10.2010, pag. 33).

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

L'allegato del regolamento (CE) n. 440/2008 è modificato conformemente all'allegato del presente regolamento.

Articolo 2

Il presente regolamento entra in vigore il terzo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, il 7 dicembre 2015

Per la Commissione

Il presidente

Jean-Claude JUNCKER

ALLEGATO

L'allegato del regolamento (CE) n. 440/2008 è così modificato:

- (1) È inserita una nota all'inizio dell'allegato, prima della parte A:

«Nota:

prima di utilizzare uno dei metodi di prova descritti di seguito per testare una sostanza multicostituente (MCS), una sostanza di composizione sconosciuta o variabile, il prodotto di una reazione complessa o di origine biologica (UVCB) o una miscela e qualora l'applicabilità del metodo di prova per le sostanze MCS, UVCB o le miscele non sia stata descritta nel rispettivo metodo di prova, è opportuno chiedersi se il metodo sia adeguato per fornire risultati scientificamente validi e pertinenti ai fini regolamentari previsti.

Se il metodo di prova è utilizzato per testare una sostanza MCS o UVCB o una miscela, è necessario rendere disponibili, nella misura del possibile, informazioni sufficienti sulla sua composizione, ad esempio tramite l'identità chimica dei costituenti, le loro proporzioni quantitative e le loro proprietà specifiche.»

- (2) È aggiunto il capitolo A.24:

«A.24. COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE (N-OTTANOLO/ACQUA), METODO DELLA CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)

INTRODUZIONE

Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 117 (2004).

1. Il coefficiente di ripartizione (P) è definito come il rapporto tra le concentrazioni all'equilibrio di una sostanza disciolta in un sistema a due fasi costituito da due solventi pressoché immiscibili. Nel caso del n-ottanolo e dell'acqua:

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{ottanolo}}{C_{\text{acqua}}}$$

Il coefficiente di ripartizione è adimensionale poiché è il quoziente di due concentrazioni, e viene generalmente espresso sotto forma del suo logaritmo decimale.

2. P_{ow} è un parametro chiave negli studi sul destino ambientale delle sostanze chimiche. È stata dimostrata l'esistenza di una relazione altamente significativa tra il P_{ow} delle sostanze in forma non ionizzata e il loro bioaccumulo nei pesci. È stato inoltre dimostrato che il P_{ow} è un parametro utile nella previsione dell'assorbimento nel terreno e nei sedimenti, nonché per stabilire relazioni quantitative struttura-attività per un'ampia gamma di effetti biologici.
3. La proposta originaria del presente metodo di prova si basava su un articolo di C.V. Eadsforth and P. Moser (1). Lo sviluppo del metodo di prova e l'esecuzione di una prova comparativa tra laboratori OCSE sono stati coordinati dall'*Umweltbundesamt* (Agenzia federale per l'ambiente) della Repubblica federale di Germania nel 1986 (2).

CONSIDERAZIONI INIZIALI

4. I valori $\log P_{ow}$ nell'intervallo da - 2 a 4 (talora fino a 5 e oltre) (¹) possono essere determinati sperimentalmente utilizzando il metodo Shake-Flask (capitolo A.8 del presente allegato, linea guida dell'OCSE n. 107). Il metodo HPLC si applica per $\log P_{ow}$ nell'intervallo da 0 a 6 (1)(2)(3)(4)/5. Questo metodo può richiedere una stima di P_{ow} per l'assegnazione di sostanze di riferimento adeguate e l'avallo delle conclusioni tratte dai risultati della prova. I metodi di calcolo sono discussi brevemente nell'Appendice del presente metodo di prova. La modalità operativa del metodo HPLC è in isocratica.
5. I valori di P_{ow} dipendono dalle condizioni ambientali quali la temperatura, il pH, la forza ionica, ecc., queste dovrebbero essere definite nell'esperimento ai fini di una corretta interpretazione dei dati P_{ow} . Per le sostanze ionizzabili potrebbe rendersi disponibile, ed essere utilizzato in alternativa, un altro metodo (ad esempio, il metodo pH-metrico per le sostanze ionizzate (6) descritto nel progetto di linea guida OCSE). Sebbene questo progetto di linea guida OCSE possa essere appropriato per determinare il P_{ow} per tali sostanze ionizzabili, in alcuni casi è più opportuno utilizzare il metodo HPLC a un pH pertinente dal punto di vista ambientale (cfr. paragrafo 9).

(¹) La fissazione di un limite superiore è imposta dalla necessità di realizzare una fase di separazione completa dopo gli adeguamenti dell'equilibrio di ripartizione e prima del prelievo dei campioni per le determinazioni analitiche. Se si presta particolare attenzione, il limite superiore può essere esteso a valori più alti di P_{ow} .

PRINCIPIO DELLA PROVA

6. Il metodo HPLC a fase inversa è condotto su colonne analitiche impaccate con una fase solida disponibile in commercio contenente idrocarburi a catena lunga (ad esempio C8, C18) chimicamente legati su silice.
7. Una sostanza chimica iniettata su una colonna di questo tipo si riparte tra la fase mobile del solvente e la fase stazionaria idrocarburica man mano che viene trasportata lungo la colonna dalla fase mobile. Le sostanze sono ritenute in proporzione al loro coefficiente di ripartizione idrocarburo-acqua con le sostanze idrofile eluite per prime e quelle lipofile per ultime. Il tempo di ritenzione è descritto dal fattore di capacità k dato dalla seguente espressione:

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

dove t_R è il tempo di ritenzione della sostanza in esame e t_0 è il tempo morto, ossia il tempo medio necessario perché una molecola di solvente passi attraverso la colonna. Non sono richiesti metodi analitici quantitativi ed è necessaria solo la determinazione dei tempi di ritenzione.

8. Il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua di una sostanza in esame può essere calcolato sperimentalmente determinando il suo fattore di capacità k e quindi inserendo k nella seguente equazione:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

dove

a, b = coefficienti di regressione lineare.

L'equazione riportata sopra può essere ottenuta mediante la regressione lineare del logaritmo dei coefficienti di ripartizione ottanolo/acqua delle sostanze di riferimento rispetto al logaritmo dei fattori di capacità delle sostanze di riferimento.

9. Il metodo HPLC a fase inversa consente di ottenere la stima dei coefficienti di ripartizione nell'intervallo del log P_{ow} compreso tra 0 e 6, ma tale intervallo può essere esteso in casi eccezionali tra 6 e 10. Ciò può richiedere la modifica della fase mobile (3). Il metodo non è applicabile a basi e acidi forti, complessi metallici, sostanze che reagiscono con l'eluente o tensioattivi. È possibile effettuare misurazioni sulle sostanze ionizzabili nella loro forma non ionizzata (acido libero o base libera) unicamente utilizzando un tampone appropriato con un pH inferiore al pK_a per un acido libero o superiore al pK_a per una base libera. Il metodo pH-metrico per l'esecuzione di prove sulle sostanze ionizzabili (6) potrebbe diventare disponibile ed essere utilizzato come metodo alternativo (6). Se il valore di log P_{ow} è determinato ai fini della classificazione dei pericoli per l'ambiente o della valutazione del rischio ambientale, la prova va eseguita nell'intervallo di pH pertinente per l'ambiente naturale, ossia con un pH compreso tra 5 e 9.
10. In alcuni casi la presenza di impurità può complicare l'interpretazione dei risultati a causa delle incertezze nell'assegnazione dei picchi. Per le miscele che risultano in una banda non risolta, si devono indicare i limiti superiore e inferiore di log P_{ow} e l'area percentuale di ciascun picco di log P_{ow} . Per le miscele costituite da un gruppo di omologhi, è necessario indicare anche la media ponderata del log P_{ow} (7), calcolata sulla base dei singoli valori P_{ow} e i corrispondenti valori percentuali dell'area di picco (8). Tutti i picchi che contribuiscono a un'area del 5 % o più dell'area totale di picco devono essere presi in considerazione nel calcolo (9):

$$\text{media ponderata log } P_{ow} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\% \text{superf.})}{\% \text{superficie totale picchi}} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\% \text{superf.})}{\sum_i \% \text{superficie}}$$

La media ponderata del log P_{ow} è valida solo per le sostanze o le miscele (ad esempio, il tallolio) costituite da omologhi (ad esempio, serie di alcani). Le misurazioni delle miscele possono restituire risultati significativi, a condizione che il rivelatore analitico utilizzato abbia la stessa sensibilità verso tutte le sostanze della miscela e che esse possano essere adeguatamente risolte.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

11. La costante di dissociazione, la formula di struttura e la solubilità nella fase mobile devono essere note prima di utilizzare il metodo. Inoltre, sarebbe utile disporre delle informazioni sull'idrolisi.

CRITERI DI QUALITÀ

12. Per aumentare l'affidabilità della misurazione, le determinazioni devono essere eseguite in duplice.
- Ripetibilità: il valore di $\log P_{ow}$ ottenuto da misurazioni ripetute effettuate nelle stesse condizioni e utilizzando lo stesso gruppo di sostanze di riferimento deve essere nell'intervallo di $\pm 0,1$ unità logaritmiche.
 - Riproducibilità: se le misurazioni sono ripetute con un altro gruppo di sostanze di riferimento, i risultati possono differire. In genere, il coefficiente di correlazione R per la relazione tra $\log k$ e $\log P_{ow}$ per un gruppo di sostanze in esame è di circa 0,9, valore corrispondente a un coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua del $\log P_{ow}$ di $\pm 0,5$ unità logaritmiche.
13. La prova comparativa interlaboratorio ha mostrato che, con il metodo HPLC, i valori di $\log P_{ow}$ possono essere ottenuti entro $\pm 0,5$ unità dei valori ottenibili con il metodo Shake-Flask (2). In letteratura è possibile trovare altre comparazioni (4)(5)(10)(11)(12). I risultati più accurati si ottengono con grafici di correlazione basati su sostanze di riferimento aventi una struttura simile (13).

SOSTANZE DI RIFERIMENTO

14. Al fine di correlare il fattore di capacità misurato k di una sostanza con il relativo P_{ow} , è necessario tracciare un grafico di taratura utilizzando almeno 6 punti (cfr. paragrafo 24). È compito dell'utilizzatore selezionare le sostanze di riferimento appropriate. Le sostanze di riferimento normalmente devono avere valori di $\log P_{ow}$ comprendenti il $\log P_{ow}$ della sostanza in esame; per esempio, almeno una sostanza di riferimento deve avere un P_{ow} superiore a quello della sostanza in esame e un'altra sostanza di riferimento deve avere un P_{ow} inferiore a quello della sostanza in esame. L'estrapolazione va utilizzata unicamente in casi eccezionali. È preferibile che tali sostanze di riferimento siano strutturalmente simili alla sostanza in esame. I valori di $\log P_{ow}$ delle sostanze di riferimento utilizzati per la taratura devono essere basati su dati sperimentali attendibili. Tuttavia, per le sostanze con un $\log P_{ow}$ elevato (generalmente superiore a 4), è possibile utilizzare valori calcolati, a meno che non si disponga di dati sperimentali attendibili. Se si utilizzano valori estrapolati, è necessario specificare un valore limite.
15. Sono disponibili lunghi elenchi di valori di $\log P_{ow}$ per molti gruppi di sostanze chimiche (14)(15). Se non sono disponibili dati sui coefficienti di ripartizione di sostanze strutturalmente simili, si può usare una taratura più generale basata su altre sostanze di riferimento. Nella tabella 1 sono elencate le sostanze di riferimento consigliate e i rispettivi valori di P_{ow} . Per le sostanze ionizzabili, i valori forniti si applicano alla forma non ionizzata. L'attendibilità e la qualità dei valori sono state verificate durante la prova comparativa interlaboratorio.

Tabella 1

Sostanze di riferimento raccomandate

	Numero CAS	Sostanza di riferimento	$\log P_{ow}$	pKa
1	78-93-3	2-butanone (metiletilchetone)	0,3	
2	1122-54-9	4-acetilpiridina	0,5	
3	62-53-3	Anilina	0,9	
4	103-84-4	Acetanilide	1,0	
5	100-51-6	alcole benzilico	1,1	
6	150-76-5	4-metossifenolo	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	acido fenossiacetico	1,4	pKa = 3,12

	Numero CAS	Sostanza di riferimento	log P _{ow}	pKa
8	108-95-2	Fenolo	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-dinitrofenolo	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	benzonitrile	1,6	
11	140-29-4	fenilacetonitrile	1,6	
12	589-18-4	alcole 4-metilbenzilico	1,6	
13	98-86-2	acetofenone	1,7	
14	88-75-5	2-nitrofenolo	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	acido 3-nitrobenzoico	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-cloroanilina	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	nitrobenzene	1,9	
18	104-54-1	alcole cinnamilico (alcole cinnamico)	1,9	
19	65-85-0	acido benzoico	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-cresolo	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	acido cinnamico	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	Anisolo	2,1	
23	93-58-3	benzoato di metile	2,1	
24	71-43-2	Benzene	2,1	
25	99-04-7	acido 3-metilbenzoico	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-clorofenolo	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	tricloroetilene	2,4	
28	1912-24-9	Atrazina	2,6	
29	93-89-0	benzoato di etile	2,6	
30	1194-65-6	2,6-diclorobenzonitrile	2,6	
31	535-80-8	acido 3-clorobenzoico	2,7	pKa = 3,82

	Numero CAS	Sostanza di riferimento	log P _{ow}	pKa
32	108-88-3	Toluene	2,7	
33	90-15-3	1-naftolo	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-dicloroanilina	2,8	
35	108-90-7	clorobenzene	2,8	
36	1746-13-0	allilfenil etere	2,9	
37	108-86-1	bromobenzene	3,0	
38	100-41-4	Etilbenzene	3,2	
39	119-61-9	benzofenone	3,2	
40	92-69-3	4-fenilfenolo	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Timolo	3,3	
42	106-46-7	1,4-diclorobenzene	3,4	
43	122-39-4	difenilammina	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naftalene	3,6	
45	93-99-2	benzoato di fenile	3,6	
46	98-82-8	isopropilbenzene	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-triclorofenolo	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Bifenil	4,0	
49	120-51-4	benzoato di benzile	4,0	
50	88-85-7	2,4-dinitro-6-sec-butilfenolo	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-triclorobenzene	4,2	
52	143-07-7	acido dodecanoico	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Difeniletere	4,2	
54	85-01-8	Fenantrene	4,5	
55	104-51-8	n-butilbenzene	4,6	

	Numero CAS	Sostanza di riferimento	log P _{ow}	pKa
56	103-29-7	Dibenzile	4,8	
57	3558-69-8	2,6-difenilpiridina	4,9	
58	206-44-0	Fluorantene	5,1	
59	603-34-9	trifenilammina	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

DESCRIZIONE DEL METODO

Stima preliminare del coefficiente di ripartizione

16. Se necessario, è possibile stimare il coefficiente di ripartizione della sostanza in esame, preferibilmente ricorrendo a un metodo di calcolo (cfr. Appendice) o, se del caso, utilizzando il rapporto della solubilità della sostanza in esame nei solventi puri.

Apparecchiatura

17. È richiesto un cromatografo in fase liquida dotato di pompa a bassi impulsi e di un sistema di rivelazione adeguato. Un rivelatore UV, che utilizza una lunghezza d'onda di 210 nm, o un rivelatore RI sono applicabili ad un'ampia gamma di gruppi chimici. La presenza di gruppi polari nella fase stazionaria può compromettere gravemente le prestazioni della colonna HPLC. Pertanto, le fasi stazionarie devono contenere una percentuale minima di gruppi polari (16). Si possono usare riempimenti commerciali a fase inversa a microparticelle o colonne preimpaccate. Si può posizionare una colonna di protezione tra il sistema di iniezione e la colonna analitica.

Fase mobile

18. Per preparare il solvente di eluizione, che viene degassato prima dell'uso, si utilizzano il metanolo per HPLC e l'acqua distillata o deionizzata. Si consiglia di optare per l'eluizione isocratica. Si devono usare rapporti metanolo/acqua con un contenuto minimo di acqua del 25 %. Normalmente, una miscela metanolo/acqua 3:1 (v/v) è soddisfacente per eluire sostanze aventi un log P pari a 6 in un'ora ad una portata di 1 ml/min. Per le sostanze con un log P superiore a 6 può essere necessario abbreviare il tempo di eluizione (e quello delle sostanze di riferimento) diminuendo la polarità della fase mobile oppure la lunghezza della colonna.
19. La sostanza in esame e le sostanze di riferimento devono essere solubili nella fase mobile, in concentrazione sufficiente a consentirne la rilevazione. Solo in casi eccezionali si possono usare degli additivi con la miscela metanolo-acqua perché modificano le proprietà della colonna. In questi casi è necessario accertarsi che i tempi di ritensione delle sostanze in esame e delle sostanze di riferimento non siano influenzati. Se la miscela metanolo-acqua non è appropriata, si possono usare altre miscele solvente organico-acqua, per esempio etanolo-acqua, acetonitrile-acqua o alcole isopropilico (2-propanolo)-acqua.
20. Il pH dell'eluente è un fattore critico per le sostanze ionizzabili. Esso deve rientrare nell'intervallo operativo di pH della colonna, che di solito è compreso tra 2 e 8. Si raccomanda di tamponare la soluzione. Occorre aver cura di evitare la precipitazione di sali e il deterioramento della colonna che si verificano con alcune miscele di fase organica/tampone. Le misurazioni mediante HPLC con fasi stazionarie a base di silice al di sopra di pH 8 non sono generalmente consigliabili perché l'uso di una fase mobile alcalina può provocare un rapido deterioramento delle prestazioni della colonna.

Soluti

21. Le sostanze in esame e di riferimento devono essere sufficientemente pure per poter assegnare i picchi nei cromatogrammi alle rispettive sostanze. Le sostanze da usare a scopo di prova o di taratura devono, se possibile, essere disciolte nella fase mobile. Se si utilizza un solvente diverso dalla fase mobile per sciogliere le sostanze in esame e di riferimento, è necessario utilizzare la fase mobile per la diluizione finale prima dell'iniezione.

Condizioni sperimentali

22. Durante la misura le variazioni della temperatura non devono essere superiori a $\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Determinazione del tempo morto t_0

23. Il tempo morto t_0 può essere misurato utilizzando sostanze organiche non ritenute (ad esempio tiourea o formammide). Un tempo morto più preciso può essere ottenuto dai tempi di ritenzione misurati o da una successione di circa 7 elementi di una serie omologa (ad esempio, n-alchilmethylchetonii) (17). I tempi di ritenzione $t_R(n_c + 1)$ sono tracciati in funzione di $t_R(n_c)$, dove n_c è il numero di atomi di carbonio. Si ottiene una retta, $t_R(n_c + 1) = A t_R(n_c) + (1 - A)t_0$, dove A , che rappresenta $k(n_c + 1)/k(n_c)$, è costante. Il tempo morto t_0 è ottenuto dall'intercetta $(1 - A)t_0$ e dal coefficiente angolare A .

Equazione di regressione

24. La fase successiva consiste nel tracciare un log di correlazione k in funzione di un log P per le sostanze di riferimento appropriate con valori di log P simili al valore previsto per la sostanza in esame. In pratica, sono iniettate simultaneamente da 6 a 10 sostanze di riferimento. La determinazione dei tempi di ritenzione è effettuata preferibilmente con un registratore-integratore collegato al sistema di rivelazione. I logaritmi corrispondenti dei fattori di capacità, log k , sono tracciati come una funzione di log P . L'equazione di regressione viene eseguita a intervalli regolari, almeno una volta al giorno, in modo da tenere conto di eventuali variazioni delle prestazioni della colonna.

DETERMINAZIONE DEL P_{ow} DELLA SOSTANZA IN ESAME

25. La sostanza in esame è iniettata nelle più piccole quantità rilevabili. Il tempo di ritenzione viene determinato in duplice. Il coefficiente di ripartizione della sostanza in esame è ottenuto mediante interpolazione del fattore di capacità calcolato sul grafico di taratura. Per coefficienti di ripartizione molto bassi o molto elevati è necessario ricorrere all'estrapolazione. In particolare in questi casi bisogna prestare attenzione ai limiti di confidenza della retta di regressione. Se il tempo di ritenzione del campione è al di fuori dell'intervallo dei tempi di ritenzione ottenuti per gli standard, è necessario specificare un valore limite.

DATI E RELAZIONE

Relazione sulla prova

26. La relazione deve includere i seguenti elementi:
- la stima preliminare del coefficiente di ripartizione (se determinata), i valori stimati e il metodo utilizzato; se è stato utilizzato un metodo di calcolo, la descrizione completa dello stesso, ivi incluse l'identificazione della base dati e informazioni dettagliate sulla scelta dei frammenti;
 - le sostanze in esame e di riferimento: la purezza, la formula di struttura e il numero CAS;
 - la descrizione dell'apparecchiatura e delle condizioni operative: la colonna analitica e la colonna di protezione;
 - la fase mobile, i mezzi di rilevamento, l'intervallo di temperatura, il pH;
 - i profili di eluizione (cromatogrammi);
 - il tempo morto e come è stato misurato;
 - i dati di ritenzione e i valori di log P_{ow} desunti dalla letteratura per le sostanze di riferimento usate nella taratura;
 - i dettagli sulla retta di regressione stimata (log k in rapporto a log P_{ow}) e il coefficiente di correlazione della retta, compresi gli intervalli di confidenza;
 - i dati di ritenzione media e il valore interpolato di log P_{ow} per la sostanza in esame;
 - nel caso di una miscela: il cromatogramma del profilo di eluizione con indicazione dei valori soglia;

- i valori di log P_{ow} in relazione all'area percentuale del picco del log P_{ow} ;
- il calcolo mediante il ricorso a una retta di regressione;
- la media ponderata dei valori di log P_{ow} calcolati, se pertinente.

BIBLIOGRAFIA

- (1) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere*. 12, 1459-1475.
- (2) W. Klein, W. Kördel, M. Weiss and H.J. Poremski. (1988). Aggiornamento della linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 107 — Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method. *Chemosphere*. 17, 361-386.
- (3) C.V. Eadsforth. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. *Pestic. Sci.* 17, 311-325.
- (4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. *Pestic. Sci.* 12, 219-277.
- (5) B. McDuffie (1981). Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. *Chemosphere*. 10, 73-83.
- (6) OECD (2000). Guideline for Testing of Chemicals — Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances. Draft Guideline, November 2000.
- (7) OSPAR (1995). "Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995", Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20-24 February 1995.
- (8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez and C. C. Karman. (1999). A User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3. August.
- (9) E. A. Vik, S. Bakke and K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. Environmental Modelling & Software Vol. 13, pp. 529-537.
- (10) L.O. Renberg, S.G. Sundstroem and K. Sundh-Nygård. (1980). Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes. *Chemosphere*. 9, 683-691.
- (11) W.E. Hammers, G.J.Meurs and C.L. De-Ligny. (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. *J. Chromatog.* 247, 1-13.
- (12) J.E. Haky and A.M. Young. (1984). Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. *J. Liq. Chromatog.* 7, 675-689.
- (13) S. Fujisawa and E. Masuhara. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography. *J. Biomed. Mater. Res.* 15, 787-793.
- (14) C. Hansch and A. J. Leo. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Wiley, New York.

-
- (15) C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir. (1982). Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity — Available from Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.
 - (16) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther.* 14, 479-488.
 - (17) G.E. Berendsen, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony, and J. Inczédy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. *J. Liq. Chromatog.* 3, 1669-1686.
-

Appendice

Metodi di calcolo del P_{ow}

INTRODUZIONE

1. Quest'appendice fornisce una breve introduzione al calcolo del P_{ow} . Per ulteriori informazioni, si rimanda il lettore ai libri di testo (1)(2).
2. I valori calcolati del P_{ow} sono utilizzati per:
 - decidere a quale metodo sperimentale ricorrere: il metodo Shake-Flask per un $\log P_{ow}$ compreso tra -2 e 4 e il metodo HPLC per un $\log P_{ow}$ tra 0 e 6;
 - selezionare le condizioni da utilizzare con HPLC (sostanze di riferimento, rapporto metanolo/acqua);
 - verificare l'attendibilità dei valori ottenuti mediante i metodi sperimentali;
 - fornire una stima quando non è possibile applicare i metodi sperimentali.

Principio dei metodi di calcolo

3. I metodi di calcolo suggeriti nel presente documento sono basati sulla frammentazione teorica della molecola in sottostrutture adatte per le quali sono noti incrementi di $\log P_{ow}$ affidabili. Il $\log P_{ow}$ è ottenuto sommando i valori dei frammenti e i termini di correzione per le interazioni intramolecolari. Sono disponibili elenchi delle costanti di frammento e dei termini di correzione (1)(2)(3)(4)(5)(6). Alcuni di questi vengono regolarmente aggiornati (3).

Affidabilità dei valori calcolati

4. In generale, l'affidabilità dei metodi di calcolo diminuisce con l'aumentare della complessità della sostanza in esame. Nel caso di molecole semplici di basso peso molecolare e con uno o due gruppi funzionali, ci si può attendere una deviazione da 0,1 a 0,3 unità di $\log P_{ow}$ tra i risultati dei differenti metodi di frammentazione e i valori misurati. Il margine di errore dipende dall'affidabilità delle costanti di frammento utilizzate, dalla capacità di riconoscere le interazioni intramolecolari (ad esempio, i legami idrogeno) e dall'uso corretto dei termini di correzione. Nel caso delle sostanze ionizzanti, è necessario tenere conto della carica e del grado di ionizzazione (10).

Metodo Fujita-Hansch π

5. La costante del sostituente idrofobo, π , introdotta originariamente da Fujita et al. (7), è definita come:

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

dove PhX è un derivato aromatico e PhH la sostanza madre.

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

Il metodo π è interessante soprattutto per le sostanze aromatiche. Sono disponibili i valori π per un gran numero di sostituenti (4)(5).

Metodo di Rekker

6. Con il metodo di Rekker (8) il valore $\log P_{ow}$ è calcolato nel modo seguente:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{termini di interazione})$$

dove a_i è il numero di volte che un dato frammento si presenta nella molecola e f_i è l'incremento $\log P_{ow}$ del frammento. I termini di interazione possono essere espressi come multiplo intero di una costante singola C_m (la cosiddetta "costante magica"). Le costanti di frammento f_i e C_m sono state ricavate da un elenco di 1 054 valori sperimentali di P_{ow} di 825 sostanze utilizzando l'analisi di regressione multipla (6)(8). La determinazione dei termini di interazione viene eseguita secondo regole fisse (6)(8)(9).

Metodo di Hansch-Leo

7. Con il metodo di Hansch e Leo (4) il valore $\log P_{ow}$ è calcolato nel modo seguente:

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

dove f_i è la costante di frammento, F_j è il termine (fattore) di correzione e a_i e b_j indicano la corrispondente frequenza con cui si presentano. Un elenco di valori di frammento costituiti da atomi e gruppi e un elenco di termini di correzione F_j sono stati ottenuti per approssimazioni successive derivandoli da valori sperimentali di P_{ow} . I termini di correzione sono stati suddivisi in varie differenti classi (1) (4). Sono stati sviluppati pacchetti software per tenere conto di tutte le regole e di tutti i termini di correzione (3).

METODO COMBINATO

8. Il calcolo del $\log P_{ow}$ di molecole complesse può essere migliorato considerevolmente se la molecola viene divisa in sottostrutture più grandi per le quali sono disponibili valori affidabili di $\log P_{ow}$, ottenuti da tabelle (3) (4) o da misurazioni esistenti. Tali frammenti (ad esempio sostanze eterocicliche, antrachinone, azobenzene) possono essere poi combinati con i valori π di Hansch o con le costanti di frammento di Rekker o Leo.

Osservazioni

- i) I metodi di calcolo sono applicabili unicamente a sostanze parzialmente o completamente ionizzate quando vengono presi in considerazione i fattori di correzione necessari.
- ii) Se si può assumere la presenza di legami idrogeno intramolecolari, è necessario aggiungere i corrispondenti termini di correzione (approssimativamente da + 0,6 a + 1,0 unità di $\log P_{ow}$) (1). Indicazioni della presenza di tali legami possono essere ottenute da modelli tridimensionali o da dati spettroscopici.
- iii) Se sono possibili varie forme tautomere, si deve assumere come base di calcolo la forma più probabile.
- iv) Bisogna seguire con attenzione le revisioni degli elenchi delle costanti di frammento.

BIBLIOGRAFIA SUI METODI DI CALCOLO

- (1) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods*, McGraw-Hill, New York (1982).
- (2) W.J. Dunn, J.H. Block and R.S. Pearlman (ed.). *Partition Coefficient, Determination and Estimation*, Pergamon Press, Elmsford (New York) and Oxford (1986).
- (3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).
- (4) C. Hansch and A.J. Leo. *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*, John Wiley, New York (1979).
- (5) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chem.. Rev.* 71, 525-616.
- (6) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther.* 14, 479-488.

- (7) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch (1964). A New Substituent Constant, π , Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 5175-5180.
- (8) R.F. Rekker. The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, vol. 1, Elsevier, New York (1977).
- (9) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere*. 12, 1459-1475.
- (10) R.A. Scherrer. ACS — Symposium Series 255, pag. 225, American Chemical Society, Washington, D.C. (1984).»

(3) Il capitolo C.3. è sostituito dal seguente:

«C.3. ALGHE DI ACQUA DOLCE E CIANOATTERI, PROVA DI INIBIZIONE DELLA CRESCITA

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 201 (2006; rettifica dell'allegato nel 2011). La revisione del metodo, nata dall'esigenza di includere nuove specie e aggiornarlo affinché soddisfi i requisiti relativi alla valutazione dei pericoli e alla classificazione delle sostanze chimiche, è stata effettuata sulla base di un'ampia esperienza pratica, del progresso scientifico nel settore degli studi di tossicità sulle alghe e di una estesa prassi normativa messa in atto fin dall'adozione del metodo iniziale.
2. L'appendice 1 contiene le definizioni di termini utili ai fini del presente metodo.

PRINCIPIO DELLA PROVA

3. La presente prova è finalizzata a determinare gli effetti di una sostanza chimica sulla crescita di microalghe di acqua dolce e/o cianobatteri. Gli organismi sperimentali in fase di crescita esponenziale sono esposti alla sostanza chimica in esame in colture batch per un periodo che dura normalmente 72 ore. Nonostante la durata relativamente breve della prova è possibile valutare gli effetti su diverse generazioni.
4. La risposta del sistema consiste nella riduzione della crescita in una serie di colture di alghe (unità di prova) esposte a varie concentrazioni della sostanza chimica in esame. La risposta è valutata come funzione della concentrazione di esposizione rispetto alla crescita media di colture di controllo identiche non esposte (repliche). Per ottenere l'espressione completa della risposta del sistema agli effetti tossici (sensibilità ottimale), le colture sono poste in condizioni idonee a una crescita esponenziale senza limitazioni, fornendo una quantità sufficiente di nutrienti e un'illuminazione continua per un periodo sufficiente a misurare la riduzione del tasso di crescita specifico.
5. La crescita e l'inibizione della crescita sono quantificate attraverso misurazioni della biomassa delle alghe in funzione del tempo. La biomassa delle alghe è espressa in peso secco per volume, per esempio mg di alghe per litro di soluzione di prova. Dato tuttavia che è difficile misurare il peso secco, si ricorre a parametri alternativi, quali il conteggio delle cellule, che è quello più utilizzato, il volume cellulare, la fluorescenza, la densità ottica ecc. Il fattore di conversione del parametro alternativo misurato in biomassa deve essere noto.
6. L'endpoint della prova è l'inibizione della crescita, espressa come l'aumento logaritmico della biomassa (tasso di crescita specifico medio) durante il periodo di esposizione. A partire dai tassi di crescita specifici medi registrati in una serie di soluzioni di prova si determina la concentrazione che causa una data percentuale di inibizione del tasso di crescita (per esempio 50 %), espressa come $E_r C_x$ (per esempio $E_r C_{50}$).
7. Un'altra variabile di risposta considerata nel presente metodo è il rendimento, che può essere necessario utilizzare per soddisfare requisiti normativi specifici di alcuni paesi. È definito come la differenza tra la biomassa al termine del periodo di esposizione e la biomassa all'inizio del periodo di esposizione. A partire dal rendimento registrato in una serie di soluzioni di prova si determina la concentrazione che causa una data percentuale di inibizione del rendimento (per esempio 50 %), espressa come $E_y C_x$ (per esempio $E_y C_{50}$).

8. Si possono inoltre determinare mediante un calcolo statistico la concentrazione minima a cui si osserva un effetto statisticamente significativo (LOEC) e la concentrazione senza effetti osservabili (NOEC).

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA CHIMICA IN ESAME

9. Le informazioni sulla sostanza chimica in esame che possono essere utili per stabilire le condizioni sperimentali comprendono la formula strutturale, la purezza, la stabilità alla luce, la stabilità alle condizioni sperimentali, le proprietà di assorbimento della luce, la pK_a e i risultati degli studi di trasformazione, inclusa la biodegradabilità nell'acqua.
10. Occorre conoscere l'idrosolubilità, il coefficiente di partizione ottanolo/acqua (P_{ow}) e la pressione di vapore della sostanza chimica in esame e disporre di un metodo convalidato per la quantificazione della sostanza chimica nelle soluzioni di prova, metodo di cui devono essere noti l'efficienza di recupero e il limite di rilevamento.

VALIDITÀ DELLA PROVA

11. Affinché la prova sia valida devono essere soddisfatti i criteri di esecuzione seguenti:
 - l'aumento esponenziale della biomassa nelle colture di controllo deve essere di un fattore almeno pari a 16 nell'arco delle 72 ore del periodo sperimentale. Questo valore corrisponde a un tasso di crescita specifico di 0,92/giorno⁻¹. Nelle specie più utilizzate il tasso di crescita è di solito assai più alto (cfr. appendice 2). Questo criterio può non essere rispettato quando si utilizzano specie che crescono più lentamente di quelle elencate nell'appendice 2, nel qual caso occorre prolungare la prova per ottenere un fattore di moltiplicazione della crescita almeno pari a 16 nelle colture di controllo, assicurandosi che la crescita sia esponenziale per tutta la prova. La durata può essere ridotta fino a un minimo di 48 ore per mantenere una crescita esponenziale senza limitazioni durante la prova, a condizione che sia raggiunto il fattore minimo di moltiplicazione 16;
 - il coefficiente medio di variazione dei tassi specifici di crescita in ogni sezione della prova (giorni 0-1, 1-2 e 2-3, per le prove di 72 ore) nelle colture di controllo (cfr. la voce "coefficiente di variazione" nell'appendice 1) non deve essere superiore a 35 %. Per il calcolo del tasso di crescita specifico per sezione, si veda il paragrafo 49. Questo criterio si applica al valore medio dei coefficienti di variazione calcolato per le repliche delle colture di controllo;
 - il coefficiente di variazione dei tassi di crescita specifici medi durante l'intero periodo di prova nelle repliche delle colture di controllo non deve superare il 7 % nelle prove con *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Desmodesmus subspicatus*. Per altre specie utilizzate con minore frequenza questo valore non deve superare il 10 %.

SOSTANZA CHIMICA DI RIFERIMENTO

12. La procedura sperimentale può essere verificata saggiando una o più sostanze chimiche di riferimento, come per esempio il 3,5-diclorofenolo utilizzato nella prova interlaboratorio (ring-test) internazionale (1). Anche il dicromato di potassio può essere utilizzato come sostanza chimica di riferimento per le alghe verdi. È preferibile effettuare una prova con una sostanza chimica di riferimento almeno due volte all'anno.

APPLICABILITÀ DELLA PROVA

13. Il presente metodo di prova si presta soprattutto per le sostanze chimiche idrosolubili le quali, alle condizioni sperimentali, con tutta probabilità permangono nell'acqua. Per saggiare sostanze chimiche volatili, fortemente adsorbenti, colorate, a bassa idrosolubilità oppure sostanze chimiche che possono influire sulla disponibilità dei nutrienti o dei minerali nel mezzo di prova, possono essere necessarie determinate modifiche della procedura descritta (per esempio sistema chiuso, condizionamento dei recipienti di prova). Nei riferimenti bibliografici (2) (3) e (4) si trovano orientamenti sulle eventuali modifiche da apportare.

DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

Apparecchiature

14. I recipienti e le altre apparecchiature destinate a entrare in contatto con le soluzioni di prova devono essere interamente di vetro o di altro materiale chimicamente inerte. Gli strumenti devono essere lavati accuratamente per assicurare che nessun contaminante organico o inorganico possa interferire con la crescita delle alghe o la composizione delle soluzioni di prova.

15. I recipienti sono in genere beute in vetro di dimensioni tali da contenere i volumi di coltura necessari per le misurazioni da effettuare durante la prova e garantire una superficie di contatto sufficiente per il trasferimento massico di CO₂ dall'atmosfera (cfr. paragrafo 30). Si noti che il volume di liquido deve essere tale da permettere le determinazioni analitiche (cfr. paragrafo 37).
16. Sono inoltre necessarie alcune o tutte le seguenti apparecchiature:
 - apparecchiature per le colture: si consiglia di utilizzare una camera o una cabina in cui la temperatura di incubazione prescelta possa essere mantenuta a ± 2 °C;
 - strumenti per la misurazione della luce: è importante tenere presente che il metodo di misurazione dell'intensità luminosa, in particolare il tipo di recettore (collettore), può influire sul valore misurato. È preferibile effettuare le misurazioni utilizzando un recettore sferico (4 π, sensibile alla luce diretta e riflessa proveniente da tutti gli angoli situati sopra e sotto il piano di misurazione) o un recettore 2 π (sensibile alla luce proveniente da tutti gli angoli situati sopra il piano di misurazione);
 - apparecchiatura per determinare la biomassa delle alghe. Il conteggio delle cellule, che è il parametro alternativo più comunemente utilizzato per determinare la biomassa delle alghe, può essere effettuato con un contatore elettronico di particelle, un microscopio con camera di conteggio o un citometro a flusso. Altri parametri alternativi per la biomassa possono essere misurati usando un citometro a flusso, un fluorimetro, uno spettrofotometro o un colorimetro. Per effettuare il calcolo è utile impiegare un fattore di conversione che metta in relazione il conteggio delle cellule e il peso secco. Per fornire misurazioni utili con basse concentrazioni di biomassa, quando si utilizza lo spettrofotometro può essere necessario usare cuvette con cammino ottico di almeno 4 cm.

Organismi sperimentali

17. Possono essere utilizzate diverse specie di microalghe e di cianobatteri che non formano aggregati. I ceppi di cui all'appendice 2 sono risultati adatti alla procedura sperimentale del presente metodo di prova.
18. Se si utilizzano altre specie, devono essere indicati il ceppo e/o la provenienza. È necessario confermare che la crescita esponenziale dell'alga selezionata per la prova può essere mantenuta per tutta la durata della prova nelle condizioni applicate.

Mezzo di crescita

19. Si consigliano due mezzi di crescita alternativi: il mezzo dell'OCSE e il mezzo AAP. Le composizioni di entrambi i mezzi sono illustrate nell'appendice 3. Si fa presente che il valore iniziale del pH e la capacità tampone (regolazione dell'aumento del pH) di questi due mezzi sono diversi. I risultati delle prove possono pertanto variare in funzione del mezzo utilizzato, soprattutto nelle prove su sostanze chimiche ionizzanti.
20. Può essere talvolta necessario modificare il mezzo di crescita, ad esempio se si saggiano metalli o agenti chelanti oppure se la prova è eseguita con diversi valori di pH. L'uso di un mezzo modificato deve essere descritto con precisione e giustificato (3)(4).

Concentrazione iniziale della biomassa

21. La biomassa iniziale deve essere la stessa in tutte le colture e sufficientemente bassa da permettere una crescita esponenziale per tutto il periodo di incubazione senza il rischio di esaurimento dei nutrienti. La biomassa iniziale non deve superare 0,5 mg/l in peso secco. Si raccomandano le seguenti concentrazioni iniziali di cellule:

Pseudokirchneriella subcapitata $5 \times 10^3 - 10^4$ cellule/ml

Desmodesmus subspicatus $2-5 \times 10^3$ cellule/ml

Navicula pelliculosa 10^4 cellule/ml

Anabaena flos-aquae 10^4 cellule/ml

Synechococcus leopoliensis $5 \times 10^4 - 10^5$ cellule/ml

Concentrazioni della sostanza chimica in esame

22. L'intervallo di concentrazione entro il quale possono verificarsi degli effetti può essere determinato in base ai risultati di precedenti prove a diversi intervalli di concentrazione. Per la prova definitiva si devono scegliere almeno cinque concentrazioni in progressione geometrica, con un fattore di separazione non superiore a 3,2. Un fattore più elevato può essere giustificato per le sostanze chimiche in esame la cui curva concentrazione-risposta è nulla. Le serie di concentrazioni devono di preferenza coprire l'intervallo che causa un'inibizione del 5 % - 75 % del tasso di crescita delle alghe.

Repliche e controlli

23. Il disegno sperimentale deve comprendere tre repliche per ogni concentrazione di prova. Se non è necessario determinare la NOEC, il disegno sperimentale può essere modificato in modo da aumentare il numero delle concentrazioni e ridurre il numero delle repliche per concentrazione. Le repliche dei controlli devono essere almeno tre e, idealmente, il doppio delle repliche utilizzate per ogni concentrazione di prova.
24. Una serie a parte di soluzioni di prova può essere preparata per le determinazioni analitiche delle concentrazioni della sostanza chimica in esame (cfr. paragrafi 36 e 38).
25. Quando la sostanza chimica in esame è solubilizzata con un solvente il disegno sperimentale deve includere controlli supplementari contenenti il solvente alla stessa concentrazione utilizzata nelle colture di prova.

Preparazione della coltura di inoculo

26. Per adattare le alghe alle condizioni sperimentali e garantire che siano nella fase di crescita esponenziale quando sono utilizzate per inoculare le soluzioni di prova, 2-4 giorni prima dell'inizio della prova si prepara una coltura di inoculo nel mezzo di prova. La biomassa delle alghe deve essere adattata affinché la coltura di inoculo mantenga una crescita esponenziale fino al momento in cui ha inizio la prova. La coltura di inoculo è incubata alle stesse condizioni delle colture di prova. Occorre misurare l'aumento della biomassa nella coltura di inoculo per verificare che, nelle condizioni di coltura, la crescita segua un andamento normale per il ceppo in esame. L'appendice 4 presenta un esempio di metodo di coltura delle alghe. Per evitare divisioni sincrone delle cellule durante la prova può essere necessaria una seconda fase di propagazione della coltura di inoculo.

Preparazione delle soluzioni di prova

27. Tutte le soluzioni di prova devono contenere le stesse concentrazioni del mezzo di crescita e la stessa biomassa iniziale delle alghe utilizzate per la prova. Le soluzioni delle concentrazioni prescelte sono di solito preparate mescolando una soluzione madre della sostanza chimica in esame con il mezzo di crescita e la coltura di inoculo. Di solito le soluzioni madri sono preparate sciogliendo la sostanza nel mezzo di prova.
28. Solventi quali acetone, alcol t-butilico e dimetilformammide possono essere utilizzati come veicoli per aggiungere sostanze chimiche a bassa idrosolubilità nel mezzo di prova (2)(3). La concentrazione di solvente non deve superare 100 µl/l e deve essere identica in tutte le colture (comprese quelle dei controlli).

Incubazione

29. I recipienti di prova, chiusi con coperchi permeabili all'aria, sono agitati e collocati nell'incubatore. Durante la prova è necessario mantenere le alghe in sospensione e agevolare il trasferimento di CO₂. A tal fine i recipienti sono agitati oppure il loro contenuto è rimescolato in permanenza. Le colture vanno mantenute ad una temperatura compresa tra 21 e 24 °C, con variazione ammissibile di ± 2 °C. Per le specie diverse da quelle di cui all'appendice 2, come per esempio le specie tropicali, può essere necessario utilizzare temperature più elevate, a condizione che i criteri di validità siano rispettati. Si raccomanda di disporre le beute all'interno dell'incubatore in maniera casuale e di cambiarne ogni giorno la posizione.
30. Il pH dei controlli non deve aumentare di oltre 1,5 unità durante la prova. Per i metalli e le sostanze chimiche che in parte ionizzano a un pH prossimo a quello della prova può essere necessario limitare l'evoluzione del pH per ottenere risultati riproducibili e chiaramente definiti. Un'evoluzione del pH inferiore a 0,5 unità è tecnicamente fattibile e può essere ottenuta inducendo un tasso adeguato di trasferimento massico di CO₂ dall'aria circostante alla soluzione di prova, per esempio aumentando l'intensità dell'agitazione. Un'altra possibilità consiste nel ridurre la domanda di CO₂ diminuendo la biomassa iniziale o la durata della prova.

31. La superficie su cui le colture sono incubate deve ricevere un'illuminazione fluorescente, continua ed uniforme, per esempio del tipo "bianca fredda" o "naturale". I requisiti di illuminazione variano in funzione dei ceppi di alghe e cianobatteri utilizzati. L'intensità della luce deve essere adeguata all'organismo sperimentale utilizzato. Per le specie di alghe verdi raccomandate l'intensità della luce a livello delle soluzioni di prova deve essere scelta nell'intervallo $60\text{--}120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, misurata nell'intervallo di lunghezza d'onda che consente la fotosintesi (400-700 nm) con un recettore adeguato. Alcune specie, in particolare l'*Anabaena flos-aquae*, crescono bene con un'intensità luminosa più bassa e possono essere danneggiate da intensità elevate. Per queste specie occorre utilizzare un'intensità luminosa media compresa tra 40 e $60 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (per quanto riguarda gli strumenti di misurazione calibrati in lux, l'intensità luminosa raccomandata di $60\text{--}120 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ corrisponde a circa 4 440 — 8 880 lux per la luce bianca fredda). Sulla zona di incubazione l'intensità luminosa non deve discostarsi più di $\pm 15\%$ dall'intensità luminosa media.

Durata della prova

32. La prova dura normalmente 72 ore, ma è possibile prolungarla o accorciarla a condizione che tutti i criteri di validità di cui al paragrafo 11 siano rispettati.

Misurazioni e determinazioni analitiche

33. La biomassa delle alghe in ogni recipiente è determinata almeno una volta al giorno durante il periodo di prova. Se le misurazioni sono effettuate su piccoli volumi prelevati dalla soluzione di prova con una pipetta, tali volumi non devono essere rimessi nella soluzione.
34. La biomassa è misurata mediante conteggio manuale delle cellule al microscopio o con un contatore elettronico di particelle (conteggio delle cellule e/o biovolume). È possibile utilizzare tecniche alternative, come per esempio la citometria a flusso, la fluorescenza clorofilliana in vitro o in vivo (5)(6) o la densità ottica, a condizione di poter dimostrare che esiste una correlazione soddisfacente con la biomassa per la gamma dei valori della biomassa della prova.
35. Il pH delle soluzioni è misurato all'inizio e alla fine della prova.
36. Se si dispone di un metodo per analizzare la sostanza chimica in esame nell'intervallo di concentrazione utilizzato, occorre analizzare le soluzioni di prova per verificare le concentrazioni iniziali e il mantenimento delle concentrazioni di esposizione durante la prova.
37. Se si presume che le concentrazioni di esposizione della sostanza chimica in esame non si discostino più del 20 % dai valori nominali durante la prova, può essere sufficiente analizzare all'inizio e alla fine della prova una concentrazione alta, una bassa e una intorno al valore EC₅₀ previsto. Si raccomanda di analizzare tutte le concentrazioni all'inizio e alla fine della prova se si presume che non si situeranno nell'intervallo dell'80-120 % della concentrazione nominale. Per le sostanze chimiche in esame volatili, instabili o fortemente adsorbenti si raccomanda di prelevare campioni aggiuntivi da analizzare ogni 24 ore durante il periodo di esposizione per definire con maggiore precisione la perdita della sostanza chimica in esame. Per queste sostanze potrebbe essere necessario aumentare il numero delle repliche. In ogni caso, la determinazione delle concentrazioni della sostanza chimica in esame è da effettuarsi soltanto in uno dei recipienti replicati (o nel contenuto mescolato di tutti i recipienti replicati).
38. I mezzi di prova appositamente preparati per l'analisi delle concentrazioni di esposizione durante la prova devono essere trattati come quelli utilizzati per le prove, devono cioè essere inoculati con alghe e incubati alle stesse condizioni. Se occorre analizzare la concentrazione della sostanza chimica in esame discolta, può essere necessario separare le alghe dal mezzo. A tal fine è preferibile procedere per centrifugazione a bassa velocità, sufficiente per far sedimentare le alghe.
39. Se è dimostrato che per tutta la durata della prova la concentrazione della sostanza chimica in esame non è variata più di $\pm 20\%$ della concentrazione nominale o della concentrazione misurata inizialmente, l'analisi dei risultati può essere basata sui valori nominali o su quelli misurati inizialmente. Se la variazione rispetto alla concentrazione nominale o a quella misurata inizialmente è superiore a $\pm 20\%$, l'analisi dei risultati deve basarsi sulla media geometrica della concentrazione durante l'esposizione o su modelli che descrivono la diminuzione della concentrazione della sostanza chimica in esame (3)(7).
40. La prova di inibizione della crescita delle alghe è un sistema sperimentale più dinamico di altre prove di tossicità acquatica a breve termine. Di conseguenza può essere difficile determinare le concentrazioni reali di

esposizione, soprattutto per le sostanze adsorbenti esaminate a basse concentrazioni. In questi casi, la scomparsa della sostanza chimica in esame dalla soluzione per adsorbimento sulla biomassa delle alghe in crescita non significa che essa sia scomparsa dal sistema sperimentale. All'atto di analizzare il risultato della prova è opportuno verificare se la diminuzione della concentrazione della sostanza chimica in esame durante la prova è accompagnata dalla diminuzione dell'inibizione della crescita. Se così fosse si potrebbe considerare l'applicazione di un modello adeguato per descrivere la diminuzione della concentrazione della sostanza chimica in esame (7). In caso contrario, può essere opportuno basare l'analisi dei risultati sulle concentrazioni iniziali (nominali o misurate).

Altre osservazioni

41. Si osserva al microscopio la coltura di inoculo per verificare che presenti un aspetto normale e sano e osservare eventuali anomalie delle alghe (che potrebbero essere causate dall'esposizione alla sostanza chimica in esame) alla fine della prova.

Prova limite

42. In determinate circostanze, per esempio quando una prova preliminare indica che la sostanza chimica in esame non ha effetti tossici in concentrazioni fino a 100 mg/l o fino al suo limite di solubilità nel mezzo di prova (si scelga il valore più basso), può essere svolta una prova limite che consiste nel confrontare le risposte di un gruppo di controllo e di un gruppo trattato (a una concentrazione di 100 mg/l o pari al limite di solubilità). È vivamente raccomandato che l'assenza di tossicità sia corroborata da un'analisi della concentrazione di esposizione. Tutti i criteri di validità e le condizioni sperimentali descritti precedentemente si applicano alla prova limite, eccezion fatta per il numero delle repliche trattate, che devono essere almeno sei. Le variabili di risposta osservate nel gruppo di controllo e nel gruppo trattato possono essere analizzate con una prova statistica che consente di confrontare le medie, per esempio con un test t di Student. Se le varianze dei due gruppi sono ineguali, si esegue un test t adattato per varianze ineguali.

DATI E RELAZIONI

Tracciato delle curve di crescita

43. La biomassa dei recipienti di prova può essere espressa nell'unità del parametro alternativo utilizzato per misurarla (per esempio, numero di cellule, fluorescenza).
44. Per rappresentare graficamente le curve di crescita si riportano in tabelle la concentrazione stimata della biomassa delle colture di prova e dei controlli, le concentrazioni del materiale in esame e i tempi delle misurazioni, approssimati almeno all'ora. In questa prima fase si potrà utilizzare sia la scala lineare che quella logaritmica, ma quest'ultima è obbligatoria e in genere rappresenta meglio le variazioni del ritmo di crescita nell'arco della prova. Si osservi che la crescita esponenziale rappresentata in scala logaritmica risulta in una retta la cui pendenza indica il tasso di crescita specifico.
45. Utilizzando i grafici, verificare se le colture dei controlli si sviluppano al tasso esponenziale previsto nel corso dell'intera prova. Studiare con attenzione tutti i punti e l'aspetto globale dei grafici, nonché verificare i dati grezzi e i procedimenti utilizzati, per rilevare eventuali errori. Verificare in particolare tutti i punti che sembrano discostarsi per un errore sistematico. Se l'individuazione degli errori del procedimento è palese e/o la probabilità di occorrenza di questi errori è elevata, il punto in causa deve essere evidenziato come valore anomalo e non deve essere incluso nella successiva analisi statistica (una concentrazione algale nulla in una delle due o tre repliche può indicare che l'inoculo non è avvenuto correttamente o che il recipiente non è stato pulito bene). Le ragioni che giustificano l'esclusione di un punto perché considerato valore anomalo devono essere esposte chiaramente nella relazione sulla prova. Sono accettate soltanto le ragioni dovute a (rari) errori metodologici e non a mera mancanza di precisione. I metodi statistici di identificazione dei valori anomali presentano un'utilità limitata per questo tipo di problema e non possono sostituire il giudizio di un esperto. È preferibile mantenere i valori anomali (segnalati come tali) tra i punti presentati su eventuali grafici o tabelle.

Variabili di risposta

46. La prova è intesa a determinare gli effetti della sostanza chimica in esame sulla crescita delle alghe. Il presente metodo di prova descrive due variabili di risposta, in quanto negli Stati membri esistono preferenze e requisiti normativi diversi. Affinché i risultati della prova siano accettabili in tutti gli Stati membri, gli effetti devono essere valutati in funzione di entrambe le variabili di risposta (a) e (b) definite di seguito:
 - (a) tasso di crescita specifico medio, calcolato in base all'aumento logaritmico della biomassa durante il periodo di prova, espresso in giorni;
 - (b) rendimento, che consiste nel valore della biomassa alla fine della prova meno il valore della biomassa all'inizio della prova.

47. Si fa presente che i valori di tossicità calcolati utilizzando queste due variabili di risposta non sono comparabili, per cui occorre tenere conto di questa differenza al momento di utilizzare i risultati della prova. I valori dell' E_C_x basati sul tasso di crescita specifico medio ($E_x C_x$) saranno generalmente superiori a quelli basati sul rendimento ($E_y C_y$), se le condizioni del presente metodo di prova sono rispettate, per via del fondamento matematico dei due approcci. Questa differenza è dovuta solo al calcolo matematico e non va considerata una differenza di sensibilità tra le due suddette variabili di risposta. Il concetto di tasso di crescita specifico medio si basa sull'andamento generale della crescita esponenziale delle alghe in colture non soggette a limitazioni; la tossicità è valutata in base agli effetti sul tasso di crescita senza tenere conto del livello assoluto del tasso di crescita specifico dei controlli, della pendenza della curva concentrazione-risposta o della durata della prova. I risultati basati sulla variabile di rendimento dipendono invece da tutte queste altre variabili. L' $E_y C_x$ dipende dal tasso di crescita specifico della specie di alga utilizzata in ciascuna prova e dal tasso di crescita specifico massimo, che può variare da una specie di alga all'altra o persino da un ceppo all'altro. Questa variabile non deve essere utilizzata per confrontare la sensibilità alle sostanze tossiche di specie o ceppi diversi di alga. Pur essendo preferibile, da un punto di vista scientifico, stimare la tossicità in base al tasso di crescita specifico medio, per i soddisfare i requisiti normativi vigenti in alcuni paesi il presente metodo di prova include anche la stima basata sul rendimento.

Tasso di crescita specifico medio

48. Il tasso di crescita specifico medio per un determinato periodo è calcolato in funzione dell'aumento logaritmico della biomassa, utilizzando la seguente equazione per ciascuna replica dei gruppi di controllo e dei gruppi trattati [1]:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \text{ (giorno}^{-1}\text{)} \quad [1]$$

dove:

μ_{i-j} è il tasso di crescita specifico medio dal momento i al momento j,

X_i è la biomassa al momento i,

X_j è la biomassa al momento j.

Per ciascun gruppo trattato e di controllo, calcolare il valore medio del tasso di crescita e le relative stime della varianza.

49. Calcolare il tasso di crescita specifico medio per l'intero periodo di prova (in genere dal giorno 0 al giorno 3), prendendo come valore di partenza il valore nominale della biomassa inoculata anziché il suo valore misurato, poiché di norma ciò permette di ottenere una maggiore precisione. Se lo strumento utilizzato per misurare la biomassa consente di determinare con sufficiente precisione una piccola biomassa di inoculo (per esempio un citometro a flusso), è possibile utilizzare il valore misurato della concentrazione iniziale della biomassa. Valutare anche il tasso di crescita in ogni sezione della prova, calcolato come il tasso di crescita specifico di ciascun giorno di prova (giorni 0-1, 1-2 e 2-3) e verificare se il tasso di crescita dei controlli rimane costante (cfr. i criteri di validità, paragrafo 11). Un tasso di crescita specifico del primo giorno sensibilmente inferiore al tasso di crescita specifico medio può indicare una fase di latenza. Sebbene sia possibile ridurre al minimo e praticamente eliminare la fase di latenza nelle colture di controllo mediante un'adeguata propagazione della precoltura, la presenza di una fase di latenza nelle colture trattate può essere indizio di una fase di recupero successiva ad uno choc tossico iniziale oppure di un'esposizione ridotta causata da una perdita della sostanza chimica in esame (anche per assorbimento sulla biomassa delle alghe) dopo l'esposizione iniziale. Il tasso di crescita sezione per sezione permette quindi di studiare i vari effetti della sostanza chimica in esame durante il periodo di esposizione. Una differenza significativa tra il tasso di crescita sezione per sezione e il tasso di crescita medio indica l'esistenza di uno scarto rispetto alla crescita esponenziale costante, il che richiede un attento esame delle curve di crescita.
50. Si calcola la percentuale di inibizione del tasso di crescita per ciascuna replica del gruppo trattato utilizzando la seguente equazione [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100 \quad [2]$$

dove:

$\%I_r$ è la percentuale di inibizione del tasso di crescita specifico medio,

μ_c è il valore medio del tasso di crescita specifico (μ) medio del gruppo di controllo,

μ_t è il tasso di crescita specifico medio delle repliche del gruppo trattato.

51. Se le soluzioni di prova sono preparate utilizzando un solvente, per calcolare la percentuale di inibizione si devono utilizzare i controlli con solvente anziché i controlli senza solvente.

Rendimento

52. Il rendimento è calcolato come differenza tra la biomassa alla fine della prova e la biomassa all'inizio della prova per ciascun recipiente del gruppo trattato e di controllo. Per ogni concentrazione di prova e di controllo si calcola un valore medio di rendimento e le relative stime della varianza. La percentuale di inibizione del rendimento ($\%I_y$) può essere calcolata per ciascuna replica del gruppo trattato, secondo la seguente formula:

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_t)}{Y_c} \times 100 \quad [3]$$

dove:

$\% I_y$ è la percentuale d'inibizione del rendimento,

Y_c è il valore medio del rendimento nel gruppo di controllo,

Y_t è il valore del rendimento delle repliche del gruppo trattato.

Tracciato della curva concentrazione-risposta

53. Riportare su un grafico la percentuale di inibizione in funzione del logaritmo della concentrazione della sostanza chimica in esame e osservare con attenzione i punti ottenuti, senza tenere conto dei punti eliminati perché considerati valori anomali durante la prima fase. Tracciare, manualmente o con programma informatico d'interpolazione, una curva approssimata tra i punti per ottenere una prima impressione del rapporto concentrazione-risposta e successivamente procedere con un metodo più esatto, di preferenza un metodo statistico computerizzato. In funzione dell'uso al quale i dati sono destinati, della qualità (precisione) e della quantità dei dati, nonché della disponibilità di strumenti di analisi dei dati, si potrà decidere (a giusto titolo in alcuni casi) di interrompere l'analisi dei dati in questa fase e considerare soltanto le cifre chiave, vale a dire i valori EC_{50} e EC_{10} (e/o EC_{20}), della curva interpolata manualmente (cfr. anche la sezione sottostante sugli effetti stimolatori). Vi sono valide ragioni per non ricorrere ad un metodo statistico, tra le quali:

- i dati trattati con strumenti informatici non danno risultati più affidabili di quelli ottenuti con il giudizio di un esperto — in queste situazioni, alcuni programmi informatici potrebbero persino non essere in grado di fornire una soluzione affidabile (le ripetizioni divergenti ecc.),
- le risposte allo stimolo della crescita non sono ben descritte dai programmi informatici disponibili (cfr. infra).

Procedure statistiche

54. L'obiettivo consiste nel descrivere in maniera quantitativa, mediante un'analisi della regressione, la relazione concentrazione-risposta. È possibile utilizzare una regressione lineare ponderata, preceduta da una trasformazione di linearizzazione dei valori che descrivono la risposta osservata — per esempio in unità probit, logit o Weibull (8), ma è preferibile applicare metodi di regressione non lineare in quanto tengono conto meglio delle irregolarità inevitabili dei dati e degli scarti rispetto alle distribuzioni regolari. Vicine allo zero o all'inibizione totale, queste irregolarità possono essere amplificate dalla trasformazione e interferire con l'analisi (8). Si fa presente che i metodi analitici standard che utilizzano le trasformazioni probit, logit o Weibull si applicano a dati quantiali (per esempio, mortalità o sopravvivenza) e devono quindi essere modificati per poter essere utilizzati con i dati relativi alla crescita o alla biomassa. Per le procedure specifiche che consentono di determinare i valori dell' EC_x a partire da dati continui si vedano i riferimenti (9)(10) e (11). L'uso di un'analisi della regressione non lineare è descritto nel dettaglio nell'appendice 5.

55. Per ciascuna variabile di risposta da analizzare, si utilizza il rapporto concentrazione-risposta per stimare i valori puntuali dell' EC_x . Laddove possibile per ogni stima si determinano i limiti di confidenza a 95 %. La corrispondenza dei dati che descrivono gli effetti rispetto al modello di regressione deve essere valutata graficamente o con metodi statistici. L'analisi della regressione deve essere effettuata basandosi sulle risposte rilevate in ogni replica e non sulle medie dei gruppi trattati. Tuttavia, se risulta difficile o impossibile costruire una curva interpolante perché i dati sono troppo dispersi, si può ricorrere ad una regressione sulle medie dei gruppi in modo da ridurre l'influenza dei valori che potrebbero essere anomali. Il ricorso a questa opzione, che si discosta dalla procedura normale, deve essere indicato nella relazione di prova e motivato dall'impossibilità di interpolare la curva dei valori delle singole repliche con risultati soddisfacenti.
56. Le stime dell' EC_{50} e i limiti di confidenza possono essere ottenuti anche mediante interpolazione lineare con bootstrapping (13), se i modelli o i metodi di regressione disponibili non sono adatti ai dati.
57. Per stimare la LOEC, e dunque la NOEC, per quanto riguarda gli effetti della sostanza chimica in esame sul tasso di crescita, è necessario paragonare le medie dei gruppi trattati mediante un'analisi della varianza (ANOVA). La media di ogni concentrazione deve poi essere confrontata con la media dei controlli ricorrendo a un metodo adeguato di comparazione multipla o di analisi della tendenza. A questo proposito possono risultare utili i test di Dunnett o di William (12)(14)(15)(16)(17). È necessario valutare se l'ipotesi di omogeneità della varianza dell'ANOVA è fondata, valutazione che può essere effettuata graficamente oppure con una prova formale (17), ad esempio con i test di Levene o di Bartlett. In particolare tramite il test di Levene. Se l'ipotesi dell'omogeneità della varianza non si conferma, può essere talvolta utile correggere i dati mediante una trasformazione logaritmica. Se l'eterogeneità della varianza è estrema e non può essere corretta con una trasformazione, si prenderanno in considerazione metodi di analisi della tendenza come, ad esempio, i test di tendenza regressivi di Jonckheere. Il riferimento bibliografico (11) fornisce ulteriori informazioni sulla determinazione della NOEC.
58. Alcuni sviluppi scientifici recenti hanno portato i ricercatori ad auspicare l'abbandono della nozione di NOEC a vantaggio di stime puntuali della CE_x basate sulla regressione. Per questa prova sulle alghe non è stato definito alcun valore appropriato di x . Tuttavia, un intervallo tra il 10 e il 20 % sembra appropriato (in funzione della variabile di risposta scelta) e nella relazione è preferibile riportare sia l' EC_{10} sia l' EC_{20} .

Stimolazione della crescita

59. Si osserva talvolta una stimolazione della crescita (inibizione negativa) a basse concentrazioni. Questo fenomeno può derivare da ormesi ("stimolazione tossica") o dall'introduzione di fattori di stimolazione della crescita, trasportati dal materiale in esame, nel mezzo utilizzato. Si fa presente che l'aggiunta di sostanze nutritive inorganiche non dovrebbe esercitare alcun effetto diretto dato che per tutta la prova il mezzo mantiene sostanze nutritive in eccesso. La stimolazione a basse concentrazioni può essere generalmente ignorata nei calcoli dell' EC_{50} , a meno che sia estrema. Tuttavia, se tale stimolazione è estrema o quando il valore x nell' EC_x da calcolare è basso, potrebbero essere necessarie procedure particolari. Si eviti, per quanto possibile, di eliminare semplicemente dall'analisi dei dati le risposte della stimolazione e, se il software di interpolazione della curva non è in grado di trattare gli effetti di tale stimolazione di lieve entità, si può fare ricorso a un'interpolazione lineare con bootstrapping. Se la stimolazione è estrema, è possibile considerare l'uso di un modello di ormesi (18).

Inibizione di origine non tossica della crescita

60. I materiali in esame che assorbono la luce possono causare una diminuzione del tasso di crescita per effetto della riduzione della quantità di luce disponibile. Occorre distinguere questi tipi di effetti fisici dagli effetti tossici modificando le condizioni sperimentali e riportandoli separatamente nella relazione. I riferimenti (2) e (3) forniscono orientamenti al riguardo.

RELAZIONE SULLA PROVA

61. La relazione sulla prova deve includere le informazioni indicate di seguito.

Sostanza chimica in esame:

- stato fisico e proprietà fisico-chimiche pertinenti, compreso il limite di solubilità in acqua,
- dati di identificazione chimica (per esempio il numero CAS), compresa la purezza (impurità).

Specie sperimentali:

- ceppo, fornitore o provenienza e condizioni di coltura utilizzate.

Condizioni sperimentali:

- data di inizio e durata della prova,
- descrizione del disegno sperimentale: recipienti, volumi delle colture, densità della biomassa all'inizio della prova,
- composizione del mezzo,
- concentrazioni di prova e repliche (per esempio, numero di repliche, numero di concentrazioni di prova e progressione geometrica applicata),
- descrizione dei metodi di preparazione delle soluzioni di prova, ivi compreso l'uso di solventi ecc.,
- apparecchiatura per le colture,
- intensità e qualità dell'illuminazione (fonte, omogeneità),
- temperatura;
- concentrazioni saggiate: concentrazioni di prova nominali e tutti i risultati delle analisi volte a determinare la concentrazione della sostanza chimica in esame nei recipienti di prova; vanno indicati anche l'efficienza di recupero del metodo e il limite di quantificazione nella matrice di prova,
- tutte le differenze rispetto al presente metodo di prova,
- metodo di determinazione della biomassa e dimostrazione della correlazione tra il parametro misurato e il peso secco.

Risultati:

- pH all'inizio e alla fine della prova in tutti i recipienti trattati,
- biomassa in ciascun recipiente in ciascun punto di misura e metodo di misura della biomassa,
- curve di crescita (biomassa in funzione del tempo),
- variabili di risposta calcolate per ciascuna replica trattata, con valore medio e coefficiente di variazione delle repliche,
- rappresentazione grafica della relazione concentrazione-risposta,
- stima della tossicità per le variabili di risposta, per esempio EC₅₀, EC₁₀ e EC₂₀ e relativi intervalli di confidenza. Qualora siano calcolate, la LOEC e la NOEC e i metodi statistici utilizzati per determinarle,
- se è stata eseguita un'analisi ANOVA, la portata dell'effetto individuato (per esempio, la differenza meno significativa),
- eventuali stimoli della crescita osservati in qualsiasi gruppo trattato,
- eventuali altri effetti osservati, per esempio alterazione morfologica delle alghe,
- discussione dei risultati, comprese le eventuali ripercussioni su di essi dovute a eventuali differenze rispetto al presente metodo di prova.

BIBLIOGRAFIA

- (1) International Organisation for Standardisation (1993). ISO 8692 Water quality — Algal growth inhibition test.
- (2) International Organisation for Standardisation (1998). ISO/DIS 14442. Water quality — Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water.
- (3) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (4) International Organisation for Standardisation (1998). ISO 5667-16 Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on Biotesting of Samples.

-
- (5) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525-2531.
 - (6) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll, *Limnology & Oceanography* 22: 919-925
 - (7) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2073-2079.
 - (8) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19: 713-718.
 - (9) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 157-167.
 - (10) Bruce, R.D.,and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 1485-1494.
 - (11) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
 - (12) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121
 - (13) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The IC_p approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
 - (14) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
 - (15) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.
 - (16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 519-531.
 - (17) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.
 - (18) Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

Appendice 1

Definizioni

Ai fini del presente metodo di prova sono usate le definizioni e le abbreviazioni seguenti.

Biomassa: peso secco della materia vivente presente in una popolazione espresso in funzione di un determinato volume, ad esempio mg di alghe per litro di soluzione di prova. La biomassa di solito corrisponde alla massa, ma ai fini della presente prova questo termine è utilizzato per riferirsi alla massa per unità di volume. Dato che nella presente prova la biomassa è in genere misurata indirettamente, tramite conteggio delle cellule, fluorescenza ecc., l'uso del termine "biomassa" si riferisce anche a queste misurazioni alternative.

Coefficiente di variazione (CV): misura adimensionale della variabilità di un parametro, definita come il rapporto della deviazione standard rispetto alla media. Può essere espresso anche con una percentuale. Il coefficiente medio di variazione del tasso di crescita specifico medio nelle repliche delle colture di controllo deve essere calcolato come segue:

1. calcolare il CV (in percentuale) del tasso di crescita specifico medio a partire dai tassi di crescita quotidiani/sezione per sezione di ciascuna replica;
2. calcolare il valore medio di tutti i valori calcolati al punto 1 per ottenere il coefficiente medio di variazione del tasso di crescita specifico quotidiano/sezione per sezione nelle repliche delle colture di controllo.

Concentrazione minima alla quale si osserva un effetto statisticamente significativo (LOEC — Lowest Observed Effect Concentration): concentrazione più bassa saggia di una sostanza alla quale si osserva un effetto di riduzione statisticamente significativo della crescita ($p < 0,05$) rispetto al controllo, nell'arco di un periodo di esposizione definito. Tutte le concentrazioni superiori alla LOEC, tuttavia, devono avere un effetto dannoso uguale o superiore a quello osservato per la LOEC. Quando queste due condizioni non possono essere soddisfatte occorre fornire una spiegazione dettagliata per spiegare come è stata scelta la LOEC (e di conseguenza la NOEC).

Concentrazione senza effetti osservati (NOEC — No Observed Effect Concentration): concentrazione di prova immediatamente inferiore alla LOEC.

EC_x: concentrazione della sostanza disciolta nel mezzo di prova che causa una riduzione dell'x % (per esempio del 50 %) della crescita dell'organismo sperimentale entro un periodo di esposizione definito (che deve essere esplicitato se diverso dalla durata completa o normale della prova). Per indicare in modo inequivoco se il valore EC si riferisce al tasso di crescita o al rendimento si utilizzano, rispettivamente, le abbreviazioni "E_rC" e "E_yC".

Mezzo di crescita: mezzo sintetico completo di coltura in cui le alghe crescono quando sono esposte alla sostanza chimica in esame. Quest'ultima è di norma disciolta nel mezzo di prova.

Rendimento: valore di una variabile di misurazione che esprime la differenza tra la biomassa al termine del periodo di esposizione e il valore della stessa variabile all'inizio del periodo di esposizione, utilizzata per esprimere l'aumento della biomassa durante la prova.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela saggia seguendo il presente metodo di prova.

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

Tasso di crescita (tasso di crescita specifico medio): aumento logaritmico della biomassa durante il periodo di esposizione.

Tasso di crescita specifico: variabile di risposta che corrisponde al quoziente della differenza dei logaritmi naturali di un parametro di osservazione (nel presente metodo di prova, la biomassa) e il periodo di tempo rispettivo.

Variabile di risposta: variabile per la stima della tossicità dedotta da qualsiasi parametro misurato che descrive la biomassa mediante vari metodi di calcolo. Per questo metodo i tassi di crescita e rendimento sono variabili di risposta ricavati dalla misura diretta della biomassa o di qualsiasi metodo alternativo menzionato.

Appendice 2

Ceppi dimostratisi idonei alla prova

Alghe verdi

Pseudokirchneriella subcapitata, (già nota come *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (già nota come *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Diatomee

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Cianobatteri

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Fonti dei ceppi

I ceppi raccomandati sono disponibili in colture unialgali provenienti dalle seguenti collezioni (in ordine alfabetico):

ATCC: American Type Culture Collection

10801 University Boulevard

Manassas, Virginia 20110-2209

Stati Uniti

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa

Institute of Freshwater Ecology

Windermere Laboratory

Far Sawrey, Ambleside

Cumbria LA22 0LP

Regno Unito

SAG: Collection of Algal Cultures

Inst. Plant Physiology

Università di Göttingen

Nikolausberger Weg 18

37073 Göttingen

Germania

UTEX Culture Collection of Algae

Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology

School of Biological Sciences

the University of Texas at Austin

Austin, Texas 78712

Stati Uniti

Aspetto e caratteristiche delle specie raccomandate

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
Aspetto	Unicellulari, curve e ritorte	Per lo più unicellulari, ovali	Bastoncelli	Catene di cellule ovali	Bastoncelli
Dimensioni (L × L) µm	8-14 × 2-3	7-15 × 3-12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Volume cellulare (µm ³ /cell)	40-60 (¹)	60-80 (¹)	40-50 (¹)	30-40 (¹)	2,5 (²)
Peso cellulare secco (mg/cell)	2-3 × 10 ⁻⁸	3-4 × 10 ⁻⁸	3-4 × 10 ⁻⁸	1-2 × 10 ⁻⁸	2-3 × 10 ⁻⁹
Tasso di crescita (³) (giorno ⁻¹)	1,5 -1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0 — 2,4

(¹) Misurato con un contatore elettronico di particelle.

(²) Calcolato sulla base delle dimensioni.

(³) Tasso di crescita generalmente osservato in mezzo OCSE esposto a un'intensità luminosa approssimativamente di 70 µE m⁻²s⁻¹ e a 21 °C.

Indicazioni particolari per la coltura e la manipolazione delle specie sperimentali raccomandate

Pseudokirchneriella subcapitata e Desmodesmus subspicatus

Queste alghe verdi sono generalmente facili da coltivare in vari mezzi di coltura. Le collezioni di colture forniscono informazioni sui mezzi adeguati. Le cellule sono generalmente separate e la densità cellulare si misura facilmente con un contatore elettronico di particelle o al microscopio.

Anabaena flos-aquae

La coltura madre si conserva in vari mezzi di crescita. In particolar modo si deve evitare che la coltura batch abbia superato la fase esponenziale di crescita al momento del rinnovo, poiché il recupero è difficile a questo punto.

Anabaena flos-aquae forma catene di cellule raccolte in spirali (aggregati). La dimensione di tali aggregati varia in funzione delle condizioni di coltura. Per determinare la biomassa può essere necessario spezzare tali aggregati per contare le cellule al microscopio o con contatore elettronico di particelle.

Le catene di sottocampioni possono essere spezzate in vari punti mediante sonicazione, per ridurre la variabilità di calcolo. Processi di sonicazione più lunghi del necessario per spezzare le catene in piccoli segmenti potrebbero distruggere le cellule. L'intensità e la durata della sonicazione devono essere identiche per ciascun gruppo trattato.

Per contribuire a compensare la variabilità si contano sufficienti campi nella griglia dell'emocitometro (almeno 400). Ciò aumenterà l'affidabilità delle determinazioni della densità al microscopio.

Dopo aver diviso le catene di cellule mediante attenta sonicazione, il volume cellulare totale di *Anabaena* può essere determinato utilizzando un contatore elettronico di particelle. La potenza della sonicazione deve essere regolata in modo da evitare di rompere le cellule.

Utilizzare un agitatore a vortice o strumento analogo per assicurare che la sospensione di alghe utilizzata per inoculare i recipienti di prova sia sufficientemente mescolata e omogenea.

I recipienti di prova devono essere posti su agitatori da banco reciproci o orbitali a circa 150 rpm. In alternativa, l'*Anabaena* può anche essere agitata ad intermittenza per evitare la formazione di aggregati. Qualora invece ciò avvenga, si provvederà a prelevare campioni rappresentativi ai fini della misura della biomassa. Un'agitazione vigorosa prima del prelievo può essere necessaria per disgregare gli ammassi algali.

Synechococcus leopoliensis

La coltura madre si conserva in diversi mezzi di crescita. Le collezioni di colture forniscono informazioni sui mezzi adeguati.

Synechococcus leopoliensis cresce formando bastoncelli isolati. La minuscola dimensione delle cellule ne rende difficile la conta al microscopio ai fini della misura della biomassa. In questo caso, è utile disporre di un contatore elettronico capace di contare particelle di dimensione fino a 1 µm. È applicabile anche la misurazione fluorimetrica in vitro.

Navicula pelliculosa

La coltura madre si conserva in diversi mezzi di crescita. Le collezioni di colture forniscono informazioni sui mezzi adeguati. Si noti che in questo caso deve essere aggiunto silicato.

Navicula pelliculosa può formare aggregati in alcune condizioni culturali. A causa della produzione lipidica, le cellule algali tendono a volte ad accumularsi nella pellicola che si forma in superficie. Se ciò avviene, si devono prendere misure apposite durante il prelievo di sottocampioni ai fini della determinazione della biomassa per garantire la rappresentatività dei campioni. Può risultare necessaria un'agitazione vigorosa, per esempio tramite un agitatore a vortice.

Appendice 3

Mezzi di crescita

Può essere utilizzato uno dei due mezzi di crescita seguenti.

- Mezzo OCSE: mezzo originale della linea guida n. 201 dell'OCSE, anche conforme alla norma ISO 8692
- Mezzo AAP dell'EPA (USA), anche conforme all'ASTM.

Nella preparazione di questi mezzi occorre utilizzare sostanze chimiche di grado reagente o analitico e acqua deionizzata.

Composizione del mezzo AAP (EPA USA) e di quello indicato nella linea guida n. 201 dell'OCSE

Componente	AAP		OCSE	
	mg/l	mM	mg/l	mM
NaHCO ₃	15,0	0,179	50,0	0,595
NaNO ₃	25,5	0,300		
NH ₄ Cl			15,0	0,280
MgCl ₂ · 6H ₂ O	12,16	0,0598	12,0	0,0590
CaCl ₂ · 2(H ₂ O)	4,41	0,0300	18,0	0,122
MgSO ₄ · 7(H ₂ O)	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K ₂ HPO ₄	1,044	0,00599		
KH ₂ PO ₄			1,60	0,00919
FeCl ₃ · 6(H ₂ O)	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
Na ₂ EDTA · 2(H ₂ O)	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H ₃ BO ₃	0,186	0,00300	0,185	0,00299
MnCl ₂ · 4(H ₂ O)	0,415	0,00201	0,415	0,00210
ZnCl ₂	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
CoCl ₂ · 6(H ₂ O)	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
Na ₂ MoO ₄ · 2(H ₂ O)	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
CuCl ₂ 2(H ₂ O)	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

La relazione molare dell'EDTA sul ferro è leggermente superiore all'unità. Ciò impedisce al ferro di precipitare e minimizza allo stesso tempo la chelazione degli ioni di metalli pesanti.

Nella prova condotta sulla diatomea *Navicula pelliculosa*, ai due mezzi deve essere aggiunto $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, per raggiungere una concentrazione di 1,4 mg di Si/l.

Il pH del mezzo è ottenuto al punto di equilibrio tra il sistema carbonato del mezzo e la pressione parziale di CO_2 nell'aria atmosferica. La relazione approssimativa tra il pH a 25 °C e la concentrazione molare di bicarbonato è espressa dalla seguente formula:

$$\text{pH}_{\text{eq}} = 11,30 + \log [\text{HCO}_3]$$

Con 15 mg/l NaHCO_3 /l, $\text{pH}_{\text{eq}} = 7,5$ (mezzo USA-EPA) e con 50 mg NaHCO_3 /l, $\text{pH}_{\text{eq}} = 8,1$ (mezzo OCSE).

Composizione degli elementi del mezzo di prova

Elemento	AAP	OCSE
	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

Preparazione del mezzo OCSE

Nutriente	Concentrazione nella soluzione madre
Soluzione madre 1: macronutrienti	
NH_4Cl	1,5 g/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Soluzione madre 2: ferro	
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	64 mg/l
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg/l

Nutriente	Concentrazione nella soluzione madre
Soluzione madre 3: oligoelementi	
H_3BO_3	185 mg/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415 mg/l
ZnCl_2	3 mg/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 mg/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 mg/l
Soluzione madre 4: bicarbonato	
NaHCO_3	50 g/l
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	

Le soluzioni madre sono sterilizzate mediante filtrazione su membrana (diametro medio dei pori: 0,2 µm) o con autoclavaggio (15 minuti a 120 °C). Conservare le soluzioni al riparo dalla luce e alla temperatura di 4 °C.

Le soluzioni madre 2 e 4 sono sterilizzate solo mediante filtrazione su membrana e non devono essere sottoposte ad autoclavaggio.

Preparare il mezzo di crescita aggiungendo all'acqua un volume adeguato delle soluzioni madre da 1 a 4.

Aggiungere a 500 ml di acqua sterilizzata:

10 ml di soluzione madre 1

1 ml di soluzione madre 2

1 ml di soluzione madre 3

1 ml di soluzione madre 4

Portare a 1 000 ml con acqua sterilizzata.

Attendere che il preparato raggiunga l'equilibrio con il CO₂ atmosferico, se necessario facendo gorgogliare aria sterile e filtrata per alcune ore.

Preparazione del mezzo AAP

- Aggiungere 1 ml di ciascuna soluzione madre di cui ai seguenti punti 2.1-2.7 a circa 900 ml di acqua deionizzata o distillata e diluire fino al volume di 1 litro.
- Preparare le soluzioni madre macronutrienti sciogliendo i seguenti composti in 500 ml di acqua deionizzata o distillata. I reagenti 2.1, 2.2, 2.3 e 2.4 possono essere combinati in un'unica soluzione madre.

2.1 NaNO_3	12,750 g
2.2 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	6,082 g

2.3	CaCl ₂ · 2H ₂ O	2,205 g
2.4	Soluzione madre micronutriente (cfr. punto 3).	
2.5	MgSO ₄ · 7H ₂ O	7,350 g
2.6	K ₂ HPO ₄	0,522 g
2.7	NaHCO ₃	7,500 g
2.8	Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	Cfr. nota 1.

Nota 1: da utilizzare solo per le diatomee. Può essere aggiunto direttamente (202,4 mg) o tramite soluzione madre per raggiungere una concentrazione finale di 20 mg/l di Si nel mezzo.

3. La soluzione madre micronutriente è preparata sciogliendo i seguenti composti in 500 ml di acqua deionizzata o distillata:

3.1	H ₃ BO ₃	92,760 mg
3.2	MnCl ₂ · 4H ₂ O	207,690 mg
3.3	ZnCl ₂	1,635 mg
3.4	FeCl ₃ · 6H ₂ O	79,880 mg
3.5	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,714 mg
3.6	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	3,630 mg
3.7	CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,006 mg
3.8	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	150,000 mg [disodio (etilendiamina-)tetracetato]
3.9	Na ₂ SeO ₄ · 5H ₂ O	0,005 mg. Cfr. nota 2.

Nota 2: da utilizzare soltanto nel mezzo per le soluzioni madre di diatomee.

4. Regolare il pH a 7,5 ± 0,1 con 0,1 N oppure 1,0 N NaOH o HCl.
5. Filtrare il mezzo in un contenitore sterile attraverso un filtro a membrana con pori di 0,22 µm se si utilizza un contatore di particelle, oppure attraverso un filtro con pori di 0,45 µm se non si utilizza il contatore di particelle.
6. Conservare il mezzo al riparo dalla luce, alla temperatura di circa 4 °C fino all'utilizzo.

Appendice 4

Esempio di metodo di coltura delle alghe

Osservazioni generali

La preparazione di colture sulla base del seguente metodo serve per ottenere colture algali destinate alle prove di tossicità.

Occorre procedere in modo da preservare le colture algali da qualsiasi contaminazione batterica. Può essere utile avviare colture axeniche, ma devono essere utilizzate colture unialgalgali.

Tutte le operazioni devono essere eseguite in condizioni sterili per evitare ogni contaminazione con batteri e altre alghe.

Apparecchiatura e materiale

Si veda alla voce "Apparecchiatura" del metodo di prova.

Metodo per ottenere colture algali

Preparazione di soluzioni nutritive (mezzi)

Tutti i sali minerali del mezzo sono preparati sotto forma di soluzioni madre concentrate e conservate al freddo e al riparo dalla luce. Queste soluzioni sono sterilizzate tramite filtrazione o autoclavaggio.

Preparare il mezzo aggiungendo la giusta quantità di soluzione madre all'acqua distillata sterile, facendo attenzione ad evitare ogni rischio di infezione. Per i mezzi solidi, aggiungere 0,8 % di agar.

Coltura madre

Le colture madri che fungono da materiale di prova iniziale sono piccole colture algali trasferite con regolarità su mezzo fresco. Se le colture non vengano usate con regolarità, esse vanno strisciare su provette inclinate riempite di agar. Le colture sono trasferite su mezzo fresco almeno una volta ogni due mesi.

Le colture madri sono coltivate in beute contenenti il mezzo adeguato (volume di circa 100 ml). Quando le alghe vengono incubate a 20 °C con illuminazione continua, è necessario un trasferimento settimanale.

Durante il trasferimento, una certa quantità di coltura "vecchia" viene trasferita con pipette sterili in una beuta contenente mezzo fresco; la quantità deve essere tale che, nel caso delle specie a crescita rapida, la concentrazione iniziale sia circa 100 volte inferiore di quella della coltura vecchia.

Il tasso di crescita di una specie può essere determinato osservando la curva di crescita. Se questa è nota, è possibile stimare la densità alla quale la coltura deve essere trasferita in un mezzo nuovo. Ciò deve essere fatto prima che la coltura raggiunga la fase di mortalità.

Precoltura

La precoltura serve a fornire un quantitativo di alghe sufficiente per l'inoculo delle colture di prova. La precoltura è incubata alle condizioni sperimentali e utilizzata quando è ancora in crescita esponenziale, solitamente dopo un periodo di incubazione compreso tra 2 e 4 giorni. Qualora contengano cellule deformate o anomale, le colture algali devono essere scartate.

Appendice 5

Analisi dei dati tramite regressione non lineare

Considerazioni generali

La risposta osservata nelle prove sulle alghe e nelle altre prove di crescita di microrganismi (aumento della biomassa) è espressa, per sua natura, da una variabile continua o metrica; tale variabile è data dalla velocità del processo se si utilizza il tasso di crescita o dalla sua integrale in funzione del tempo se si sceglie la biomassa. Queste due variabili sono raffrontate con il corrispondente risultato medio osservato su repliche dei controlli non esposti che presentano la risposta massima alle condizioni imposte, in cui la luce e la temperatura sono i principali fattori determinanti nelle prove sulle alghe. Il sistema è distribuito o omogeneo e la biomassa può essere considerata un continuum, senza considerare le singole cellule. La distribuzione della varianza del tipo di risposta di tale sistema dipende soltanto dai fattori sperimentali (descritti generalmente dalle distribuzioni log-normale o normale dell'errore), contrariamente a quanto avviene negli esperimenti biologici classici i cui effetti sono espressi con dati quantali e per i quali spesso si presume che la tolleranza (generalmente con distribuzione binomiale) di ciascun organismo costituisca la componente dominante della varianza. In questo caso, le risposte dei controlli hanno valore zero o quello del livello di fondo.

Nella situazione semplice, la risposta normalizzata o relativa (r) diminuisce monotonicamente da 1 (inibizione nulla) a 0 (inibizione al 100%). Si noti che tutte le risposte hanno un errore associato e che le inibizioni negative evidenti possono essere calcolate come risultato del solo errore casuale.

Analisi della regressione

Modelli

Un'analisi della regressione mira a descrivere quantitativamente la curva concentrazione-risposta sotto forma di funzione matematica della regressione $Y = f(C)$ o, più frequentemente, $F(Z)$ dove $Z = \log C$. La funzione inversa, $C = f^{-1}(Y)$ permette di calcolare i valori EC_x , compresi i valori EC_{50} , EC_{10} e EC_{20} , e i corrispondenti limiti di confidenza a 95 %. Molte funzioni matematiche semplici hanno dimostrato di descrivere correttamente la relazione concentrazione-risposta ottenuta nelle prove di inibizione della crescita delle alghe. Fra dette funzioni rientrano, per esempio, l'equazione logistica, l'equazione asimmetrica di Weibull e la distribuzione log-normale, che sono tutte curve sigmoidee tendenti asintoticamente a zero per $C \rightarrow 0$ e a 1 per $C \rightarrow \text{infinito}$.

L'uso di modelli di funzioni soglia continue (per esempio il modello di Kooijman per "l'inibizione della crescita della popolazione", Kooijman et al, 1996) costituisce una soluzione proposta recentemente in alternativa ai modelli asintotici. Questo modello suppone che non si producano effetti a concentrazioni inferiori ad una certa soglia, EC_0^+ , stimata tramite estrapolazione della relazione concentrazione-risposta che consiste nell'intercettare l'asse delle concentrazioni per mezzo di una funzione continua semplice non differenziabile al punto di partenza.

Si fa presente che l'analisi può essere una semplice minimizzazione delle somme dei quadrati dei residui (supponendo che la varianza sia costante) o dei quadrati ponderati se l'eterogeneità della varianza è compensata.

Procedimento

Scegliere un'equazione funzionale adeguata, $Y = f(C)$, e interpolare i dati con una regressione non lineare. Utilizzare preferibilmente le misure rilevate in ciascuna beuta anziché i valori medi delle repliche, per trarre quante più informazioni possibile dai dati. D'altra parte, se la varianza è elevata, l'esperienza pratica induce a supporre che le medie delle repliche possono fornire una stima matematica più solida, meno influenzata dagli errori casuali dei dati rispetto a ciascun punto preso singolarmente.

Rappresentare su un grafico i valori misurati e la curva interpolata e verificare se l'interpolazione è adeguata. L'analisi dei valori residui può essere uno strumento particolarmente utile a questo proposito. Se la funzione scelta per interpolare la curva concentrazione-risposta non descrive bene l'intera curva o un segmento fondamentale di questa, per esempio l'effetto alle basse concentrazioni, si scelga un altro modello di interpolazione, per esempio una curva asimmetrica, quale la funzione di Weibull, anziché la funzione simmetrica. Le inibizioni negative possono porre problemi con, per esempio, la funzione di distribuzione log-normale, che richiede parimenti una funzione

alternativa di regressione. È sconsigliato assegnare un valore nullo o un valore positivo di piccola entità a questi valori negativi perché ciò distorce la distribuzione degli errori. Per stimare i valori di EC_{xlow} può essere utile procedere a interpolazioni separate su parti della curva, per esempio il segmento in cui l'inibizione relativa è bassa. Sulla base dell'equazione interpolata (con "stima inversa", C = f⁻¹(Y)), calcolare stime specifiche caratteristiche della EC_x e riportare almeno la EC₅₀ e una o due EC_{xlow}. L'esperienza maturata nelle prove pratiche ha dimostrato che la precisione della prova sulle alghe permette generalmente di ottenere una stima ragionevolmente precisa con soglia di inibizione del 10 % se i punti disponibili sono sufficientemente numerosi — a meno che non si produca una stimolazione alle basse concentrazioni, che renderebbe confusi i risultati della prova. La precisione della stima dei valori EC₂₀ è spesso migliore di quelli EC₁₀, perché la EC₂₀ si situa generalmente sulla parte quasi lineare della curva centrale concentrazione-risposta. A volte, la EC₁₀ può essere difficile da interpretare a causa della stimolazione di crescita, di modo che, sebbene la EC₁₀ si ottenga generalmente con una precisione sufficiente, si raccomanda di riportare sempre anche la EC₂₀.

Fattori di ponderazione

In generale, la varianza sperimentale non è costante e include una componente proporzionale; per questo motivo risulta opportuno procedere regolarmente ad una regressione ponderata. I fattori di ponderazione per tale analisi sono generalmente considerati inversamente proporzionali alla varianza:

$$W_i = 1/\text{Var}(r_i)$$

Molti programmi di regressione permettono di effettuare un'analisi della regressione ponderata con fattori di ponderazione riportati in una tabella. Per maggiore semplicità, conviene normalizzare i fattori di ponderazione moltiplicandoli per n/Σ w_i (n è il numero dei punti) di modo che la loro somma risulti 1.

Normalizzare le risposte

La normalizzazione con il valore medio delle risposte dei controlli pone alcuni problemi di principio e dà luogo ad una struttura della varianza piuttosto complicata. Dividendo i valori ottenuti dalle prove per il valore medio ottenuto dai controlli al fine di ottenere la percentuale di inibizione, si introduce un errore supplementare dovuto all'errore sulla media dei controlli. A meno che l'errore sia trascurabile, si devono correggere i fattori di ponderazione applicati alla regressione e i limiti di confidenza in funzione della covarianza con il controllo (Draper and Smith, 1981). Si sottolinea l'importanza di ottenere un'elevata precisione nella stima della media dei valori di controllo, per ridurre al minimo la varianza complessiva delle risposte relative. Tale varianza si calcola con la seguente formula:

(il deponente i è riferito al livello di concentrazione i e il deponente 0 ai controlli)

$$Y_i = \text{risposta relativa} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

con una varianza $\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \approx (\partial Y_i / \partial r_i) \cdot \text{Var}(r_i) + ((\partial Y_i / \partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0))$

e poiché $(\partial Y_i / \partial r_i) = 1/r_0$ and $(\partial Y_i / \partial r_0) = r_i/r_0^2$

con una distribuzione normale dei dati e delle repliche m_i and m₀ replicates: $\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$

la varianza totale della risposta relativa, Y_i diventa quindi:

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

L'errore sulla media dei controlli è inversamente proporzionale alla radice quadrata del numero di repliche dei controlli utilizzato per il calcolo della media, e a volte è giustificato includere dati storici, riducendo così l'errore in modo sensibile. Un metodo alternativo consiste nel non normalizzare i dati né interpolare i valori relativi alle risposte assolute, ivi comprese le risposte dei controlli, bensì introdurre il valore della risposta dei controlli come parametro aggiuntivo da interpolare mediante regressione non lineare. Con una classica equazione di regressione a due parametri, questo metodo richiede l'interpolazione di 3 parametri e richiede pertanto più punti rispetto alla regressione non lineare su dati normalizzati utilizzando un valore predeterminato della risposta dei controlli.

Intervalli di confidenza inversi

Il calcolo degli intervalli di confidenza di una regressione non lineare mediante una stima inversa è abbastanza complesso e generalmente non rientra fra le opzioni standard dei normali programmi informatici di calcolo statistico. Intervalli di confidenza approssimativi possono essere ottenuti con programmi classici di regressione non lineare, tramite una riparametrizzazione (Bruce e Versteeg, 1992) consistente nel riformulare l'equazione matematica con le stime desiderate, per esempio la EC₁₀ e la EC₅₀, come parametri da stimare [data la funzione I = f (α, β, concentrazione), si utilizzino le relazioni di definizione f (α, β, EC₁₀) = 0,1 e f (α, β, EC₅₀) = 0,5 per sostituire f (α, β, concentrazione) con una funzione equivalente g (EC₁₀, EC₅₀, concentrazione)].

Un calcolo più diretto (Andersen et al, 1998) consiste nel mantenere l'equazione di origine e applicare un'espansione di Taylor attorno alle medie di r_i e r₀.

Negli ultimi anni si sono diffusi i metodi bootstrapping. Questi metodi utilizzano i dati misurati e un ricampionamento frequente diretto da un generatore di numeri casuali, per stimare la distribuzione empirica della varianza.

BIBLIOGRAFIA

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. Water Research, 30, 1625-1632.

Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1485-1494

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998): Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics, 3, 405-420.»

(4) Il capitolo C.11 è sostituito dal seguente:

«C. 11. FANGHI ATTIVI, PROVA DI INIBIZIONE DELLA RESPIRAZIONE (OSSIDAZIONE DEL CARBONIO E DELL'AMMONIO)

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 209 (2010). Si tratta della descrizione di un metodo per la determinazione degli effetti di una sostanza chimica sui microrganismi dei fanghi attivi (in gran parte batteri), misurandone i tassi di respirazione (ossidazione del carbonio e/o dell'ammonio) in determinate condizioni in presenza di diverse concentrazioni della sostanza in esame. Il metodo di prova si basa sul test messo a punto dall'ETAD (*The Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufacturers*) (1) e (2), sulla precedente linea guida dell'OCSE n. 209 (3) e sulla norma ISO 8192 rivista (4). Il metodo di prova ha lo scopo di fornire un procedimento rapido di screening per valutare gli effetti delle sostanze chimiche sui microrganismi dei fanghi attivi nella fase biologica (aerobica) dei trattamenti negli impianti di depurazione delle acque reflue. I risultati della prova possono anche servire da indicatore delle concentrazioni idonee e non inibitorie delle sostanze chimiche in esame da utilizzare nelle prove di biodegradabilità (ad esempio i capitoli C.4 A-F, C.9, C.10, C.12 e C.29 del presente allegato, la linea guida OCSE n. 302C). In tal caso, la prova può essere eseguita come prova di screening, simile a una prova di definizione dell'intervallo delle concentrazioni o a una prova limite (cfr. paragrafo 39), prendendo in considerazione unicamente la respirazione totale. Tuttavia, è opportuno tener conto con cautela di queste informazioni per le prove di pronta biodegradabilità (cfr. capitolo C.4, A-F, e capitolo C.29 del presente allegato), per le quali la concentrazione dell'inoculo è significativamente inferiore a quella utilizzata nel presente metodo di prova. Infatti, l'assenza di inibizione in questa prova di respirazione non garantisce automaticamente condizioni inibitorie nelle prove di pronta biodegradabilità dei capitoli C.4, A-F, o C.29 del presente allegato.

2. Nel complesso, la prova di inibizione della respirazione sembra essere stata applicata con successo da quando è stata pubblicata per la prima volta, ma in alcuni casi sono stati segnalati risultati spuri, ad esempio (2) (4) (5). Quindi, le curve di respirazione in funzione della concentrazione a volte risultano bifasiche, i tracciati dose-risposta possono essere distorti e i valori EC₅₀ sono risultati inaspettatamente bassi (5). Dalle indagini è emerso che tali risultati si ottengono in caso di prove su fanghi attivi notevolmente nitrificanti e se la sostanza chimica in esame ha un effetto maggiore sull'ossidazione dell'ammonio che sulla generale ossidazione eterotrofica. Pertanto, è possibile ovviare ai risultati spuri mediante ulteriori prove, utilizzando un apposito inibitore della nitrificazione. Misurando il tasso di consumo di ossigeno in presenza e in assenza di un inibitore (ad esempio N-allitiourea, ATU), è possibile calcolare il tasso di consumo di ossigeno, rispettivamente, dell'ossidazione totale, dell'ossidazione eterotrofica e della nitrificazione (4) (7) (8). È dunque possibile determinare gli effetti inibitori della sostanza chimica in esame sui due processi ed è possibile calcolare con il metodo classico i valori EC₅₀ sia per l'ossidazione del carbonio organico (eterotrofica) sia per l'ossidazione dell'ammonio (nitrificazione). Va osservato che in alcuni rari casi, l'effetto inibitorio della N-allitiourea può essere parzialmente o completamente annullato se essa forma dei complessi con le sostanze chimiche in esame o con un additivo del mezzo, per esempio gli ioni Cu⁺⁺(6). Gli ioni Cu⁺⁺ sono essenziali per le *Nitrosomonas*, ma sono tossici in concentrazioni elevate.

3. La necessità di ricorrere alla nitrificazione nel trattamento aerobico delle acque reflue, in quanto tappa necessaria nel processo di eliminazione dei composti azotati dalle acque reflue mediante denitrificazione e ottenimento di prodotti gassosi, è diventato particolarmente urgente nei paesi europei; l'UE ha attualmente abbassato i limiti massimi di concentrazione dell'azoto negli effluenti trattati riversati nelle acque riceventi (1).

4. Nella maggior parte dei casi, è sufficiente ricorrere solo al metodo per valutare l'effetto sui processi di ossidazione del carbonio organico. Tuttavia, in alcuni casi è necessario esaminare l'effetto sulla sola nitrificazione, o, separatamente, sulla nitrificazione e sull'ossidazione del carbonio organico, per poter interpretare i risultati e comprendere gli effetti.

PRINCIPIO DELLA PROVA

5. I tassi di respirazione dei campioni di fanghi attivi alimentati con liquami artificiali sono misurati in una cella chiusa contenente un elettrodo a ossigeno, dopo un periodo di contatto di 3 ore. Per uno scenario d'esposizione realistico, potrebbero essere appropriati dei tempi di contatto più lunghi. Se la sostanza chimica in esame è rapidamente degradata, ad esempio tramite idrolisi abiotica, oppure presenta una volatilità che non permette di mantenerne adeguatamente la concentrazione, è possibile anche utilizzare un tempo di esposizione più corto, ad esempio 30 minuti. Il giorno stesso dell'esposizione occorre controllare la sensibilità di ciascun lotto di fanghi attivi, tramite una sostanza chimica di riferimento adeguata. La prova serve generalmente a determinare il valore EC_x (per esempio EC₅₀) della sostanza chimica in esame e/o la sua concentrazione senza effetti osservabili (NOEC).

6. È possibile determinare separatamente l'inibizione del consumo di ossigeno da parte dei microrganismi che ossidano il carbonio organico e dei microrganismi che ossidano l'ammonio, ricorrendo alla misura dei tassi di assorbimento di ossigeno in assenza e in presenza di N-allitiourea, un inibitore specifico dell'ossidazione dell'ammonio in nitriti da parte dei batteri nitrificanti della prima fase. In questo caso la percentuale di inibizione del tasso di consumo di ossigeno è calcolata comparando il tasso di consumo di ossigeno in presenza della sostanza chimica in esame con il tasso medio di consumo di ossigeno dei controlli corrispondenti senza la sostanza chimica in esame, sia in presenza sia in assenza dell'inibitore specifico (N-allitiourea).

7. Il calcolo del tasso di consumo di ossigeno in miscele acquose contenenti la sostanza chimica in esame e liquame artificiale, senza i fanghi attivi, permette di determinare ogni consumo di ossigeno derivante da processi abiotici.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA CHIMICA IN ESAME

8. È necessario disporre dell'identificazione chimica (di preferenza il numero CAS), del nome (di preferenza il nome IUPAC), delle caratteristiche di purezza, idrosolubilità, tensione di vapore, volatilità e adsorbimento della sostanza chimica in esame, in modo da permettere la corretta interpretazione dei risultati. Le sostanze chimiche volatili non possono normalmente essere sottoposte a prova in modo adeguato, se non dopo aver preso particolari precauzioni (cfr. paragrafo 21).

(1) Direttiva 91/271/CEE del Consiglio, del 21 maggio 1991, concernente il trattamento delle acque reflue urbane (GU L 135 del 30.5.1991, pag. 40).

APPLICABILITÀ DEL METODO DI PROVA

9. Il metodo di prova può essere applicato alle sostanze chimiche idrosolubili, scarsamente solubili e volatili. Tuttavia, non è sempre possibile ottenere i valori EC₅₀ con sostanze chimiche limitatamente solubili; inoltre, è possibile ottenere risultati validi con sostanze chimiche volatili soltanto a condizione che la maggior parte (per esempio > 80 %) della sostanza chimica in esame rimanga nella miscela di reazione alla fine del o dei periodi di esposizione. In caso di incertezza sulla stabilità o volatilità della sostanza chimica in esame, è necessario fornire dati analitici supplementari che permettano di stabilire la concentrazione corrispondente di EC_x.

SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

10. Le sostanze chimiche di riferimento devono essere testate periodicamente al fine di garantire che il metodo e le condizioni di prova siano affidabili, e per verificare la sensibilità di ciascun lotto di fanghi attivi utilizzati come inoculo batterico il giorno stesso dell'esposizione. La sostanza raccomandata come sostanza chimica inibitrice di riferimento è il 3,5-diclorofenolo (3,5-DCP), in quanto si tratta di un noto inibitore della respirazione e viene utilizzato in vari tipi di prove di inibizione/tossicità (4). Anche il solfato di rame (II) pentaadriato può essere utilizzato come sostanza chimica di riferimento per l'inibizione della respirazione totale (9). La N-metilanilina può essere utilizzata come inibitore di riferimento specifico della nitrificazione (4).

CRITERI DI VALIDITÀ E RIPRODUCIBILITÀ

11. Il tasso di consumo di ossigeno dei controlli in bianco (senza la sostanza chimica in esame o la sostanza chimica di riferimento) non deve essere inferiore a 20 mg di ossigeno per un grammo di fanghi attivi (peso secco dei solidi sospesi) all'ora. Se il tasso è inferiore, la prova deve essere ripetuta con fanghi attivi lavati o con fanghi provenienti da un'altra fonte. Il coefficiente di variazione del tasso di consumo di ossigeno nei controlli replicati non deve superare il 30 % alla fine della prova definitiva.
12. Nel 2004, in una prova interlaboratorio internazionale organizzata dall'ISO (4) che utilizzava fanghi attivi provenienti da liquami domestici, il valore EC₅₀ del 3,5-DCP è risultato essere compreso nell'intervallo tra 2 mg/l e 25 mg/l per la respirazione totale, tra 5 mg/l e 40 mg/l per la respirazione eterotrofica e tra 0,1 mg/l e 10 mg/l per la respirazione legata alla nitrificazione. Se il valore EC₅₀ del 3,5-DCP non si situa nell'intervallo previsto, occorre ripetere la prova con fanghi attivi provenienti da un'altra fonte. Il valore EC₅₀ del solfato di rame (II) pentaadriato deve essere compreso nell'intervallo 53-155 mg/l per la respirazione totale (9).

DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

Recipienti e apparecchiature di prova

13. Occorre utilizzare normali apparecchiature di laboratorio e quanto indicato di seguito:
- recipienti di prova — usare ad esempio becher da 1 000 ml per contenere 500 ml di miscela di reazione (cfr. punto 5, fig. 1);
 - cella e dispositivi di fissaggio per misurare la concentrazione di ossigeno disciolto; un idoneo elettrodo a ossigeno; una cella chiusa per contenere il campione senza spazio di testa e un registratore (cfr. ad esempio i punti 7, 8, 9, figura 1 dell'appendice 2). In alternativa, è possibile utilizzare una bottiglia per BOD con un manicotto idoneo che consenta di sigillare l'elettrodo a ossigeno al collo della bottiglia (cfr. figura 2 dell'appendice 3). Per evitare la perdita di liquido per sversamento quando si inserisce l'elettrodo a ossigeno, è opportuno inserire dapprima un imbuto o un tubo di vetro attraverso il manicotto oppure utilizzare recipienti con bordi svasati. In entrambi i casi è opportuno utilizzare un agitatore magnetico o un metodo di agitazione alternativo, ad esempio una sonda auto-agitatrice;
 - agitatori e ancorette magnetici, ricoperti di materiale inerte, destinati ad essere utilizzati nella camera di misurazione e/o nei recipienti di prova;
 - dispositivo di aerazione: se necessario, far passare aria compressa attraverso un filtro appropriato per eliminare polvere e olio e attraverso bottiglie di lavaggio contenenti acqua per umidificare l'aria. Il contenuto dei recipienti va aerato con pipette Pasteur, o altri dispositivi di aerazione che non adsorbono sostanze chimiche. È possibile utilizzare un agitatore orbitale operante a velocità comprese tra 150 e 250 giri al minuto con matracci da 2 000 ml di capacità, ad esempio, per soddisfare la domanda di ossigeno dei fanghi e superare difficoltà derivanti da sostanze chimiche che producono eccessiva schiuma, oppure sono volatili e rischiano di sfuggire al mezzo reattivo, o che sono difficili da disperdere se aerate mediante gorgogliamento. Il sistema di prova consiste di solito in una serie di becher aerati in modo continuo e in scala sequenziale (ad esempio, a intervalli di circa 10-15 minuti) e poi analizzati nello stesso ordine. È possibile utilizzare qualsiasi strumentazione certificata che consenta, simultaneamente, di aerare e misurare il tasso di consumo di ossigeno nelle miscele;

- e) pH-metro;
- f) centrifuga, centrifuga da laboratorio classica per fanghi in grado di girare a 10 000 m/s².

Reagenti

14. Occorre utilizzare sempre reagenti di grado analitico.

Acqua

15. Utilizzare acqua distillata o deionizzata, contenente meno di 1 mg/l di DOC, salvo quando viene prescritto l'uso di acqua di rubinetto non clorata.

Liquami artificiali

16. La composizione qualitativa e quantitativa del mezzo è la seguente:

— peptone	16 g
— estratto di carne (o estratto vegetale comparabile)	11 g
— urea	3 g
— cloruro di sodio (NaCl)	0,7 g
— cloruro di calcio diidrato (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0,4 g
— solfato di magnesio eptaaidrato (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,2 g
— monoidrogenofosfato di potassio anidro (K ₂ HPO ₄)	2,8 g
— acqua distillata o deionizzata per 1 litro	

17. Questa soluzione deve avere un PH pari a 7,5 ± 0,5. Se non viene utilizzata subito, la soluzione preparata dovrà essere conservata al buio a temperature comprese tra 0 °C e 4 °C per una settimana al massimo, o in condizioni tali da non subire alterazioni nella composizione. Occorre osservare che questo liquame artificiale è 100 volte più concentrato di quello descritto nella relazione tecnica dell'OCSE "Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents", dell'11 giugno 1976, con inoltre l'aggiunta di idrogenofosfato dipotassico.
18. In alternativa, i componenti del mezzo di coltura possono essere sterilizzati individualmente prima dello stocaggio, oppure il peptone e l'estratto di carne possono essere aggiunti poco prima di effettuare l'analisi. Prima dell'uso, il mezzo deve essere accuratamente mescolato ed il suo pH dovrà essere corretto se necessario fino a portarlo a 7,5 ± 0,5.

Sostanza chimica in esame

19. Per le sostanze in esame facilmente solubili in acqua va preparata una soluzione madre, a una concentrazione che non ecceda il limite di solubilità in acqua (per evitare precipitazioni). Le sostanze scarsamente solubili in acqua, le miscele a base di componenti di varia solubilità e le sostanze adsorbenti vanno pesate direttamente nei recipienti di prova. In casi simili, il ricorso a soluzioni madre può costituire un'alternativa valida se, prima di aggiungere i fanghi attivi, viene svolta un'analisi delle concentrazioni delle sostanze chimiche in esame disciolte nei recipienti di prova. Se si ricorre al metodo Water Accommodated Fractions (WAF), è altresì necessario determinare analiticamente le concentrazioni delle sostanze chimiche in esame disciolte nei recipienti di prova. Occorre evitare di utilizzare solventi organici, emulsionanti/disperdenti per migliorare la solubilità. È possibile trattare con ultrasuoni le soluzioni madre e pre-agitare le sospensioni, ad esempio la notte precedente, se la stabilità della sostanza chimica in esame è sufficientemente attestata in tali condizioni.
20. La sostanza chimica in esame potrebbe influenzare negativamente il pH nel sistema di prova. Prima di procedere alla prova occorre determinare il pH delle miscele con la sostanza chimica in esame attraverso una prova preliminare che stabilisca se vi sia la necessità di regolare il pH prima di svolgere la prova principale e poi, nuovamente, il giorno del suo svolgimento. Le soluzioni/sospensioni acquose della sostanza chimica in esame devono essere neutralizzate prima di aggiungere l'inoculo, se necessario. Tuttavia, poiché la neutralizzazione può modificare le proprietà chimiche della sostanza chimica, è consigliabile procedere a ulteriori prove, a seconda della finalità dello studio, per valutare l'effetto della sostanza in esame sui fanghi quando il pH non è regolato.

21. Gli effetti tossici delle sostanze chimiche volatili, soprattutto nelle prove in cui l'aria è gorgogliata nel sistema, possono produrre livelli di effetti variabili derivanti da perdite di sostanza nel corso del periodo di esposizione. Occorre quindi procedere con cautela con tali sostanze, effettuando un'analisi specifica della miscela di controllo contenente la sostanza e modificando la modalità di aerazione.

Sostanza chimica di riferimento

22. Se viene utilizzato il 3,5-diclorofenolo come sostanza chimica di riferimento, occorre preparare una soluzione di 1,00 g di 3,5-diclorofenolo in 1 000 ml di acqua (15). La dissoluzione è accelerata tramite un trattamento ad ultrasuoni e/o l'uso di acqua calda, che servono per portare a volume la soluzione dopo che si è raffreddata a temperatura ambiente. Tuttavia, occorre garantire che la struttura della sostanza chimica di riferimento non venga modificata. Il pH della soluzione va controllato e regolato a 7 — 8, se necessario, con l'aggiunta di NaOH oppure H₂SO₄.
23. Se la sostanza chimica di riferimento è il solfato di rame (II) pentaedrato, vengono utilizzate concentrazioni a 58 mg/l, 100 mg/l e 180 mg/l (un fattore pari a 1,8). La sostanza viene pesata direttamente nei recipienti di prova (29 - 50 - 90 mg per 500 ml di volume totale). È poi disiolta in autoclave con 234 ml di acqua di rubinetto. Il solfato di rame (II) pentaedrato è facilmente solubile. A prova iniziata, vengono aggiunti 16 ml di liquame artificiale e 250 ml di fanghi attivi.

Inibitore specifico della nitrificazione

24. Occorre preparare una soluzione madre di 2,32 g/l di N-allitiourea (ATU). L'aggiunta di 2,5 ml di questa soluzione madre a una miscela di incubazione del volume finale di 500 ml produce una concentrazione finale di 11,6 mg ATU/l (10^{-4} mol/l), che si sa essere sufficiente (4) a causare il 100 % di inibizione della nitrificazione in fanghi attivi nitrificanti contenenti 1,5 g/l di solidi sospesi.

Controlli abiotici

25. In rare circostanze, una sostanza chimica in esame con forti proprietà riducenti può comportare un consumo di ossigeno abiotico misurabile. Sono allora necessari controlli abiotici per distinguere tra il consumo abiotico di ossigeno dovuto alla sostanza chimica in esame e quello dovuto alla respirazione microbica. I controlli abiotici sono preparati omettendo l'inoculo dalle miscele sperimentali. Analogamente, è possibile includere controlli abiotici senza inoculo al momento di analizzare la concentrazione ottenuta nella fase di esposizione (ad esempio quando si usano soluzioni madre a base di sostanze chimiche scarsamente idrosolubili oppure miscele di componenti con diversi gradi di idrosolubilità). In casi specifici, può essere necessario preparare un controllo abiotico con inoculo sterilizzato (ad es. sterilizzando in autoclave o aggiungendo sostanze tossiche sterilizzanti). Alcune sostanze chimiche possono produrre o consumare ossigeno solo a condizione che la superficie dove avviene la reazione sia sufficientemente ampia, anche se normalmente necessitano di una temperatura o una pressione molto superiori affinché la reazione abbia luogo. A tale riguardo, bisogna prestare particolare attenzione alle sostanze perossidiche. Un inoculo sterilizzato fornisce una superficie sufficientemente ampia.

Inoculo

26. I fanghi attivi per uso generale devono essere raccolti all'uscita, o in prossimità dell'uscita, del serbatoio di aerazione di un impianto ben gestito per il trattamento delle acque reflue, alimentato principalmente da liquami domestici. A seconda della finalità della prova, si possono eventualmente utilizzare altri tipi o fonti di fanghi attivi adattati, ad esempio fanghi ricostituiti in laboratorio, con una concentrazione di solidi in sospensione che si situì tra 2 g/l e 4 g/l. Tuttavia, i fanghi provenienti da diversi impianti di trattamento avranno probabilmente caratteristiche e sensibilità diverse.
27. I fanghi possono essere utilizzati così come sono stati raccolti, ma occorre eliminare le particelle grossolane mediante sedimentazione per un breve periodo, da 5 a 15 minuti, e quindi far decantare o setacciare lo strato superficiale contenente le particelle solide più sottili (setaccio con maglie da 1 mm²). In alternativa, è possibile omogenizzare i fanghi con un miscelatore per circa 15 secondi o più a lungo, ma tenendo debito conto della forza trasversale e del cambiamento di temperatura causati da un periodo di miscelazione prolungato.

28. È spesso necessario lavare i fanghi, ad esempio quando la velocità di respirazione endogena è bassa. In primo luogo, i fanghi vanno centrifugati per un determinato periodo (ad esempio 10 minuti a circa 10 000 m/s²) per produrre un surnatante chiaro e pellet di solidi delle acque reflue. Il surnatante va scartato e i fanghi risospesi in acqua di rubinetto non clorata, agitandoli; l'acqua di lavaggio va rimossa attraverso una nuova centrifugazione per poi scartarla nuovamente. Il lavaggio e la centrifugazione vanno ripetuti, se necessario. Occorre determinare il peso secco compreso in un determinato volume di fanghi (costituiti da solidi risospesi), che poi vengono concentrati eliminando la frazione liquida oppure, al contrario, vengono diluiti con acqua di rubinetto non clorata in modo da ottenere la concentrazione di solidi richiesta, vale a dire 3 g/l. I fanghi attivi devono essere aerati continuamente (ad es. 2 l/min) alla temperatura della prova e, se possibile, vanno utilizzati il giorno stesso della raccolta. Se non è possibile farlo, i fanghi vanno alimentati quotidianamente con liquame artificiale (50 ml di liquame artificiale per litro di fanghi attivi), per altri due giorni. I fanghi vengono poi utilizzati per la prova: i risultati sono ritenuti validi, a condizione che non venga rilevato alcun cambiamento significativo nella loro attività, rispetto ai tassi di respirazione eterotrofica endogena da un lato e di respirazione legata alla nitrificazione dall'altro.
29. Nel periodo di incubazione possono insorgere difficoltà dovute all'apparizione di schiuma che, se deborda dai recipienti di aerazione, trasporta con sé particelle solide dei fanghi. In alcuni casi la schiuma è semplicemente prodotta dai liquami artificiali, ma occorre prevedere che si formi se la sostanza chimica in esame è, o contiene, un tensioattivo. La perdita di solidi dei fanghi dalle miscele di prova comporta dei tassi di respirazione artificialmente più bassi che potrebbero essere erroneamente interpretati come risultanti da un'inibizione. Inoltre, l'aerazione di una soluzione di tensioattivi fa concentrare queste sostanze nello strato di schiuma; la perdita di schiuma dal dispositivo di prova renderà più deboli le concentrazioni di esposizione. La schiuma può essere controllata attraverso semplici metodi meccanici (ad esempio tramite agitazione manuale occasionale, con una bacchetta di vetro) o con l'addizione di un agente antischiuma siliconico privo di tensioattivi, e/o aerando attraverso il metodo del dibattimento in pallone. Se il problema è legato alla presenza di liquami artificiali, la composizione di questi ultimi viene modificata dall'aggiunta di un agente antischiuma in proporzione di 50 µl/l, ad esempio. Se è invece la sostanza chimica di prova a causare la schiuma, la quantità necessaria a ridurre la schiuma va determinata per la concentrazione massima, e tutti i recipienti di aerazione sono in seguito trattati con la stessa quantità (compresi quelli che non contengono schiuma, come quelli dei controlli in bianco e i recipienti di riferimento). Qualora siano utilizzati agenti antischiuma, non deve verificarsi alcuna interazione con l'inoculo e/o la sostanza chimica in esame.

PROCEDURA SPERIMENTALE

30. È possibile determinare l'inibizione di tre diversi consumi di ossigeno (totale, eterotrofico e dovuto alla nitrificazione). Di norma, la misura dell'inibizione totale del consumo di ossigeno può considerarsi adeguata. Tuttavia, conviene determinare gli effetti sul consumo di ossigeno eterotrofico legati all'ossidazione del carbonio organico, da una parte, e all'ossidazione dell'ammonio dall'altra parte, quando alcune sostanze specifiche esigono la valutazione di questi due criteri supplementari oppure (se del caso) per spiegare le curve dose-risposta atipiche relative all'inibizione del consumo di ossigeno totale.

Condizioni sperimentali

31. La prova va svolta a una temperatura che si situa nell'intervallo 20±2 °C.

Miscele di prova

32. Le miscele di prova (F_T come nella tabella 1) contenenti acqua, liquame artificiale e la sostanza in esame vanno preparate in modo da ottenere diverse concentrazioni nominali della sostanza chimica in esame (cfr. tabella 1 per esempi dei volumi dei componenti). Il pH deve essere aggiustato a 7,5 ± 0,5, se necessario; le miscele sono diluite con acqua e va aggiunto l'inoculo, fino a ottenere gli stessi volumi finali nei recipienti, per poi dare inizio all'aerazione.

Miscele di riferimento

33. Le miscele di riferimento (F_R) sono preparate come le miscele di prova, ma con la sostanza chimica di riferimento, ad esempio 3,5-diclorofenolo, invece della sostanza in esame.

Controlli in bianco

34. I controlli in bianco (F_B) vanno preparati all'inizio e alla fine del periodo di esposizione nelle prove che prevedono becher allestiti in modo sequenziale a intervalli regolari. Per i sistemi di prova con apparecchiature che consentono la misurasimultanea dei diversi consumi di ossigeno, occorre prevedere almeno due controlli in bianco per ogni lotto di analisi simultanee. I controlli in bianco contengono un uguale volume di fanghi attivi e mezzo artificiale ma non la sostanza chimica in esame né quella di riferimento. Essi devono essere diluiti con acqua per ottenere lo stesso volume della miscela contenente la sostanza in esame o quella di riferimento.

Controlli abiotici

35. Se necessario, ad esempio se si sospetta o si ha la certezza che una sostanza chimica abbia forti proprietà riducenti, occorre preparare una miscela F_A per misurare il consumo abiotico di ossigeno. La miscela deve contenere la stessa quantità di sostanza chimica in esame e di liquame artificiale e avere lo stesso volume delle miscele sperimentali, ma senza fanghi attivi.

Procedura generale e misurazioni

36. Le miscele di prova e di riferimento insieme ai controlli in bianco e a quelli abiotici vengono incubati alla temperatura di prova in condizioni di aerazione forzata (da 0,5 a 1 l/min), in modo da mantenere la concentrazione dell'ossigeno disciolto sopra al 60 — 70 % di saturazione e assicurare che i fiocchi dei fanghi siano perennemente in sospensione. Occorre inoltre agitare le colture per mantenere i fiocchi di fanghi in sospensione. Si considera che l'incubazione abbia inizio al primo contatto dell'inoculo di fanghi attivi con gli altri componenti della miscela finale. Al termine dell'incubazione, cioè alla fine di un periodo di esposizione stabilito (in genere 3 ore), i campioni vengono ritirati per misurare la velocità di riduzione della concentrazione di ossigeno disciolto nella cella adibita all'uovo (fig. 2 dell'appendice 3) o in una bottiglia per BOD completamente piena. Le condizioni in cui si dà inizio all'incubazione dipendono anche dalla capacità di misurare i tassi di consumo di ossigeno da parte dell'apparecchiatura utilizzata. Per esempio, se l'apparecchiatura comprende un'unica sonda per l'ossigeno, le misurazioni vanno effettuate individualmente. In tal caso, le varie miscele necessarie per la prova del liquame artificiale saranno preparate senza l'inoculo, e una quantità adeguata di fanghi sarà aggiunta a ciascun recipiente della serie. Ogni incubazione sarà avviata a turno, ad intervalli convenientemente prestabili, ad esempio ogni 10 o 15 minuti. In alternativa, il sistema di misurazione può comprendere sonde multiple che facilitano misurazioni multiple e simultanee; in questo caso, è possibile aggiungere l'inoculo contemporaneamente in più gruppi appropriati di recipienti.
37. La concentrazione di fanghi attivi in tutte le miscele di prova (di riferimento e in bianco, ma non nei controlli abiotici) è nominalmente pari a 1,5 g/l di solidi sospesi. Il consumo di ossigeno va misurato dopo 3 ore di esposizione. Nei casi in cui ciò sia necessario (descritti al paragrafo 5) occorre effettuare ulteriori misurazioni dopo 30 minuti supplementari.

Potenziale di nitrificazione dei fanghi

38. Per decidere se i fanghi abbiano potere nitrificante, e, in caso affermativo, quale ne sia il tasso, occorre preparare miscele (F_B) come nel controllo in bianco e miscele di "controllo" supplementari (F_N), che contengano però anche N-alliltiourea a 11,6 mg/l. Queste miscele vanno aerate e incubate a $20^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ per 3 ore. In seguito, occorre misurare i tassi di consumo di ossigeno e calcolare il tasso di consumo di ossigeno dovuto alla nitrificazione.

Disegni sperimentali

Prova per la definizione dell'intervallo

39. Se del caso, occorre allestire una prova preliminare per valutare l'intervallo di concentrazioni della sostanza chimica in esame necessarie in una prova definitiva di determinazione dell'inibizione del consumo di ossigeno. In alternativa, l'assenza di inibizione del consumo di ossigeno da parte della sostanza chimica in esame in una prova preliminare può dimostrare che non sia necessario procedere a una prova definitiva; tuttavia, occorre includere dei triplicati che presentano la concentrazione più alta tra quelle testate nella prova preliminare (generalmente 1 000 mg/L, ma questo valore dipende dai dati che è necessario ottenere).

Tabella 1

Esempi di miscele per una prova preliminare

Reagente	Concentrazione iniziale				
Componenti delle miscele	Dosaggio nei recipienti di prova ^(a)				
	F _{T1}	F _{T2}	F _{T3-5}	F _{B1-2}	F _A
Soluzione madre della sostanza chimica in esame			10 g/l		
Soluzione madre del mezzo artificiale			Cfr. paragrafo 16		
Sospensione madre di fanghi attivi			3 g/l di solidi sospesi		
Soluzione madre della sostanza chimica in esame (ml) (paragrafi da 19 a 21)	0,5	5	50	0	50
Soluzione madre di liquame artificiale (ml) (paragrafo 16)	16	16	16	16	16
Sospensione di fanghi attivi (ml) (paragrafi da 26 a 29)	250	250	250	250	0
Acqua (paragrafo 15)	233,5	229	184	234	434
Volume totale delle miscele (ml)	500	500	500	500	500
Concentrazioni nella miscela					
Sospensione di prova (mg/l) Fanghi attivi	10	10	1 000	0	1 000
(solidi in sospensione) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

^(a) Seguire la stessa procedura con la sostanza chimica di riferimento, per preparare i matracci F_{R1-3}

40. La prova deve essere eseguita con almeno tre concentrazioni della sostanza chimica in esame, per esempio, 10 mg/l, 100 mg/l e 1 000 mg/l, con un controllo in bianco e, se necessario, almeno tre controlli abiotici con le più alte concentrazioni della sostanza in esame (cfr. ad esempio la tabella 1). Idealmente, la concentrazione più bassa non dovrebbe avere alcun effetto sul consumo di ossigeno. Occorre calcolare i tassi di consumo di ossigeno e il tasso di nitrificazione, se rilevante; va poi calcolata l'inibizione percentuale. In funzione dello scopo della prova, è inoltre possibile determinare semplicemente la tossicità di una concentrazione limite, ad es. 1 000 mg/l. Se a questa concentrazione non si verifica alcun effetto tossico statisticamente significativo, non è necessario procedere ad ulteriori prove con concentrazioni più elevate o minori. Occorre notare che le sostanze scarsamente solubili in acqua, le miscele a base di componenti di varia solubilità e le sostanze adsorbenti vanno pesate direttamente nei recipienti di prova. In tal caso, il volume riservato alla soluzione madre della sostanza di prova va sostituito con acqua di diluizione.

Prova definitiva

Inibizione del consumo totale di ossigeno

41. La prova va eseguita utilizzando una gamma di concentrazioni dedotta dalla prova preliminare. Per ottenere contemporaneamente un valore NOEC e un valore EC_x (ad es. EC₅₀), si raccomandano, nella maggior parte dei casi, sei concentrazioni di controllo e cinque concentrazioni di trattamento, in progressione geometrica, con cinque repliche. Il controllo abiotico non deve essere ripetuto se non si è registrato consumo di ossigeno nella prova preliminare; invece, in caso di consumo significativo, occorre includere controlli abiotici per ciascuna concentrazione della sostanza chimica in esame. La sensibilità dei fanghi va verificata utilizzando la sostanza chimica di riferimento (3,5-diclorofenolo). La sensibilità dei fanghi va verificata per ciascuna serie di prove, in quanto è noto che essa tende a fluttuare. In tutti i casi i campioni vanno prelevati dai recipienti di prova dopo 3 ore (e, se necessario, anche dopo 3 ore e 30 minuti), per misurare il tasso di assorbimento di ossigeno nella cella dotata di elettrodo a ossigeno. In base ai dati raccolti, vengono calcolate le velocità di respirazione specifiche delle miscele di controllo e di prova; la percentuale di inibizione viene quindi calcolata a partire dall'equazione 7, indicata di seguito.

Differenziazione tra inibizione della respirazione eterotrofica e nitrificazione

42. L'uso di un inibitore specifico della nitrificazione (ATU) consente di verificare direttamente gli effetti inibitori della sostanza chimica in esame sull'ossidazione eterotrofica; è inoltre possibile calcolare gli effetti sul tasso di nitrificazione sottraendo dal tasso totale di consumo (senza ATU) il tasso di consumo di ossigeno in presenza di ATU. Occorre preparare due serie di miscele di reazione secondo i disegni sperimentali per la determinazione dei valori EC_x o NOEC di cui al paragrafo 41; inoltre, occorre aggiungere l'inibitore ATU a ciascuna miscela di una delle due serie, per ottenere una concentrazione finale di 11,6 mg/l, in quanto è stato dimostrato che questa concentrazione impedisce completamente la nitrificazione in fanghi con concentrazioni di solidi sospesi fino a 3 000 mg/l (4). I tassi di consumo di ossigeno vanno misurati dopo il periodo di esposizione; questi valori diretti rappresentano unicamente la respirazione eterotrofica, e gli scostamenti tra questi risultati e i tassi di respirazione totale associati corrispondono alla nitrificazione. Vengono poi calcolati i vari gradi di inibizione.

Misurazioni

43. Alla fine del o dei periodi di esposizione, un campione viene trasferito dal primo recipiente di aerazione alla cella dotata di elettrodo a ossigeno (figura 1 dell'appendice 2), per procedere immediatamente alla misurazione della concentrazione dell'ossigeno disciolto. Se è disponibile un sistema a elettrodi multipli, le misurazioni possono essere effettuate simultaneamente. È fondamentale che l'agitazione (tramite ancoretta magnetica) avvenga alla stessa velocità applicata al momento di tarare l'elettrodo, in modo da garantire una risposta rapida della sonda alle variazioni nella concentrazione dell'ossigeno, e per assicurare la regolarità e la riproducibilità delle misurazioni dell'ossigeno nel recipiente di misurazione. Alcuni sistemi con elettrodi a ossigeno sono dotati di un agitatore generalmente adeguato. Tra una misurazione e l'altra la cella va sciacquata con acqua. In alternativa, si può utilizzare il campione per riempire una bottiglia per BOD (figura 2 dell'allegato 3) munita di un agitatore magnetico. Inserire una sonda dell'ossigeno con manicotto adattatore nel collo della bottiglia e avviare l'agitatore magnetico. In entrambi i casi la concentrazione di ossigeno disciolto deve essere misurata in continuo e registrata per un determinato periodo, solitamente 5 — 10 minuti, o finché la concentrazione di ossigeno scende al di sotto di 2 mg/l. Occorre poi rimuovere l'elettrodo, rimettere la miscela nel recipiente di aerazione e, se è necessario procedere a misurazioni dopo periodi di esposizione più estesi, continuare ad aerarla e agitarla.

Verifica della concentrazione della sostanza chimica in esame

44. In alcuni casi, può essere necessario misurare la concentrazione della sostanza chimica nei contenitori di prova. Va osservato che se si utilizzano soluzioni madre:
- sostanze scarsamente idrosolubili,
 - miscele con componenti aventi diversi gradi di idrosolubilità,
 - sostanze caratterizzate da una buona idrosolubilità ma la cui soluzione madre presenta una concentrazione prossima al limite di solubilità in acqua,

la frazione disciolta non sarà nota, come non lo sarà la concentrazione effettiva della sostanza in esame che viene trasferita nei recipienti di prova. Al fine di caratterizzare l'esposizione, è necessaria una stima analitica delle concentrazioni della sostanza chimica nei recipienti di prova. Per una maggior semplificazione, la stima analitica va svolta prima di aggiungere l'inoculo. Dal momento che soltanto le frazioni disciolte vengono trasferite nei recipienti di prova, le concentrazioni misurate possono essere molto basse.

45. Al fine di evitare analisi onerose in termini di tempo e di costi, si raccomanda semplicemente di pesare la sostanza in esame direttamente nei recipienti di prova e, per i calcoli successivi, di fare riferimento alla concentrazione nominale iniziale corrispondente a tale massa. È inutile operare una distinzione tra frazione disciolta, non disciolta e adsorbita della sostanza chimica in esame, in quanto tutte queste frazioni appaiono in condizioni reali negli impianti di trattamento delle acque reflue, e possono variare a seconda della composizione di queste ultime. L'obiettivo del presente metodo di prova è di produrre una stima realistica della concentrazione non inibitrice: il metodo non è adatto a determinare in dettaglio quali frazioni contribuiscono all'inibizione degli organismi dei fanghi attivi. Infine, le sostanze adsorbenti vengono anch'esse pesate direttamente nei loro recipienti di prova che devono essere in vetro silanizzato per minimizzare le perdite per adsorbimento.

DATI E RELAZIONE

Calcolo dei tassi di consumo di ossigeno

46. I tassi di consumo di ossigeno sono calcolati a partire dalla media dei valori misurati, ad esempio utilizzando la parte lineare delle curve della concentrazione di ossigeno in funzione del tempo, limitando i calcoli alle concentrazioni di ossigeno tra 2,0 mg/l e 7,0 mg/l, poiché sia le basse che le elevate concentrazioni possono anch'esse influire sul tasso di consumo. Tuttavia, talvolta è inevitabile, nonché necessario, lavorare su valori che si situano al di fuori di questa forchetta, ad esempio quando la respirazione è fortemente inibita e, di conseguenza, molto lenta, oppure se particolari fanghi attivi respirano molto rapidamente. Ciò è accettabile, a condizione che le sezioni della curva del consumo di ossigeno siano lineari e il loro gradiente non cambi ai limiti dell'intervallo 2,0 mg/l o 7,0 mg/l di O₂. Le sezioni curve del grafico indicano una stabilizzazione del sistema di misurazione o un'alterazione del tasso di consumo, e non vanno quindi utilizzate per il calcolo dei tassi di respirazione. Il tasso di consumo di ossigeno è espresso in milligrammi per litro e per ora (mg/lh) o in milligrammi per grammo di fanghi secchi per ora (mg/gh). Il tasso di consumo di ossigeno, R, in mg/lh, può essere dedotto o stimato a partire dalla sezione lineare della curva di quantità d'ossigeno decrescente, secondo l'equazione 1:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \quad (1)$$

dove:

Q_1 è la concentrazione di ossigeno all'inizio della sezione di curva lineare selezionata (mg/l);

Q_2 è la concentrazione di ossigeno alla fine della sezione di curva lineare selezionata (mg/l);

Δ_t è l'intervallo di tempo tra le due misure di cui sopra (min.).

47. Il tasso di respirazione specifica (R_s) è espresso come quantità di ossigeno consumata per grammo di sostanza secca di fanghi per ora (mg/gh), secondo l'equazione 2:

$$R_s = R/SS \quad (2)$$

dove SS è la concentrazione di solidi sospesi nella miscela di prova (g/l).

48. I diversi indici di R che possono essere combinati sono:

S tasso specifico

T tasso corrispondente alla respirazione totale

N tasso di respirazione legato alla nitrificazione

H tasso di respirazione eterotrofica

A tasso corrispondente ai processi abiotici

B tasso (medio) basato su prove in bianco

Calcolo del tasso di consumo di ossigeno dovuto alla nitrificazione

49. La relazione tra la respirazione totale (R_T), la respirazione legata alla nitrificazione (R_N) e la respirazione eterotrofica (R_H) è fornita dall'equazione 3:

$$R_N = R_T - R_H \quad (3)$$

dove:

R_N è il tasso di consumo di ossigeno dovuto alla nitrificazione (mg/lh);

R_T è il tasso misurato di consumo di ossigeno del controllo in bianco (senza ATU; F_B) (mg/lh);

R_H è il tasso misurato di consumo di ossigeno del controllo in bianco con ATU (F_N) (mg/lh).

50. Questa relazione è valida per i valori dei controlli in bianco (R_{NB} , R_{TB} , R_{HB}), i controlli abiotici (R_{NA} , R_{TA} , R_{HA}) e le prove con le sostanze chimiche (R_{NS} , R_{TS} , R_{HS}) (mg/gh). I tassi di respirazione specifici sono calcolati a partire da:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6)$$

51. Se in una prova preliminare il valore R_N non è significativo (ad es. < 5 % di R_T nei controlli in bianco), si può presumere che il consumo di ossigeno eterotrofico sia pari al consumo totale e che non si verifichi alcuna nitrificazione. Se le prove devono tenere conto degli effetti sui microrganismi eterotrofici e nitrificanti, è necessaria una fonte alternativa di fanghi attivi. Viene svolta una prova definitiva qualora si verifichi una soppressione nel consumo di ossigeno con diverse concentrazioni della sostanza chimica di prova.

Calcolo della percentuale di inibizione

52. La percentuale di inibizione del consumo totale di ossigeno, I_T , determinata per ciascuna concentrazione della sostanza chimica in esame, è calcolata con l'equazione 7:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100 \% \quad (7)$$

53. Allo stesso modo, la percentuale di inibizione del consumo eterotrofico di ossigeno, I_H , determinata per ciascuna concentrazione della sostanza chimica in esame, è calcolata con l'equazione 8:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \times 100 \% \quad (8)$$

54. Infine, l'inibizione del consumo di ossigeno dovuta alla nitrificazione, I_N , determinata per ciascuna concentrazione della sostanza chimica in esame, è calcolata con l'equazione 9:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100 \% \quad (9)$$

55. Occorre tracciare l'inibizione percentuale del consumo di ossigeno in base al logaritmo della concentrazione della sostanza chimica in esame (curva di inibizione, cfr. figura 3 dell'appendice 4). Le curve di inibizione vengono tracciate per ciascuna fase di aerazione di 3 ore, eventualmente aggiungendo 30 minuti supplementari. La concentrazione della sostanza chimica in esame corrispondente a un'inibizione del 50 % del consumo di ossigeno (EC_{50}) va calcolata o stimata a partire da questo grafico. Se sono disponibili dati adeguati, è possibile calcolare o stimare i limiti di confidenza al 95 % del valore di EC_{50} , la pendenza della curva e i valori rilevanti che rappresentano l'inizio dell'inibizione (ad esempio, EC_{10} o EC_{20}) e la fine dell'intervallo di inibizione (ad esempio, EC_{80} o EC_{90}).

56. Va sottolineato che, vista la variabilità che spesso caratterizza i risultati, in molti casi può essere sufficiente esprimere in ordine di grandezza, per esempio:

$EC_{50} < 1 \text{ mg/l}$

EC_{50} da 1 mg/l a 10 mg/l

EC_{50} da 10 mg/l a 100 mg/l

$EC_{50} > 100 \text{ mg/l}$

Interpretazione dei risultati

EC_x

57. I valori EC_x, inclusi i corrispondenti limiti di confidenza al 95 % superiori e inferiori per il parametro, sono calcolati utilizzando metodi statistici adeguati (ad esempio analisi probit, funzione logistica o funzione di Weibull, metodo di Spearman-Karber semplificato o interpolazione semplice (11)). Si ottiene un valore EC_x inserendo il valore corrispondente all'x % della media del gruppo di controllo nell'equazione ottenuta. Per calcolare il valore EC₅₀ o qualsiasi altro valore EC_x, occorre sottoporre le medie per ciascun gruppo di trattamento (x) a un'analisi di regressione.

Stima della NOEC

58. Se si procede a un'analisi statistica per determinare la NOEC, è necessario essere in possesso di statistiche per ciascun recipiente (ogni singolo recipiente è considerato una replica distinta). Occorre far ricorso a metodi statistici appropriati, conformemente al documento di orientamento dell'OCSE intitolato *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application* (11). In generale, gli effetti avversi della sostanza chimica in esame rispetto al controllo sono analizzati procedendo a una verifica dell'ipotesi unilaterale (più debole) con p ≤ 0,05.

Relazione sulla prova

59. La relazione sulla prova comprende le informazioni riportate di seguito.

Sostanza chimica in esame

- nome comune, nome chimico, numero CAS, purezza;
- proprietà fisico-chimiche della sostanza in esame (ad esempio log K_{ow}, idrosolubilità, tensione di vapore, costante di Henry (H) ed eventuali informazioni sul destino della sostanza in esame, per esempio adsorbimento sui fanghi attivi);

Sistema di prova

- origine, condizioni di funzionamento dell'impianto di trattamento delle acque reflue e affluenti da esso ricevuti, concentrazione, pretrattamento e manutenzione dei fanghi attivi;

Condizioni sperimentali

- temperatura della prova, pH durante la prova, durata della o delle fasi di esposizione;

Risultati

- consumo specifico di ossigeno dei controlli (mg di O₂/(g fanghi × h));
- insieme dei dati calcolati, curva o curve di inibizione e metodo di calcolo di EC₅₀;
- EC₅₀ e, se possibile, limiti di confidenza al 95 %, eventualmente EC₂₀, EC₈₀; eventualmente NOEC e metodi statistici utilizzati, se non è possibile determinare il valore EC₅₀;
- risultati per l'inibizione totale e, se del caso, dell'inibizione dovuta alla respirazione eterotrofica e di quella dovuta alla nitrificazione;
- consumo abiotico di ossigeno nel controllo chimico-fisico (se utilizzato);
- nome della sostanza chimica di riferimento e risultati ottenuti con la stessa;
- tutte le osservazioni e le eventuali deviazioni dal protocollo standard che potrebbero aver condizionato il risultato.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Brown, D., Hitz, H.R. and Schäfer, L. (1981). The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10 (3): 245-261.
- (2) King, E. F. and Painter H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1(1): 27-39.
- (3) OCSE (1984), Fanghi attivi: saggio di inibizione della respirazione, linea guida dell'OCSE n. 209 (*Activated sludge, Respiration inhibition test, Test Guideline No. 209*), Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- (4) ISO (2007). ISO 8192 Water Quality- Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation, International Organization for Standardization.
- (5) Bealing, D. J. (2003). Document ISO/TC147/WGI/N.183, International Organization for Standardization.
- (6) Painter, H A, Jones K (1963). The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-organisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471-483.
- (7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1:515-524.
- (8) Robra, B. (1976). Wasser/Abwasser 117, 80.
- (9) Fiebig S. and Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test — acc. to the OECD guideline 209. *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.
- (10) ISO (1995). ISO 10634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in aqueous medium, International Organization for Standardization.
- (11) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

Appendice 1

Definizioni

Le definizioni seguenti si applicano al presente metodo di prova.

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

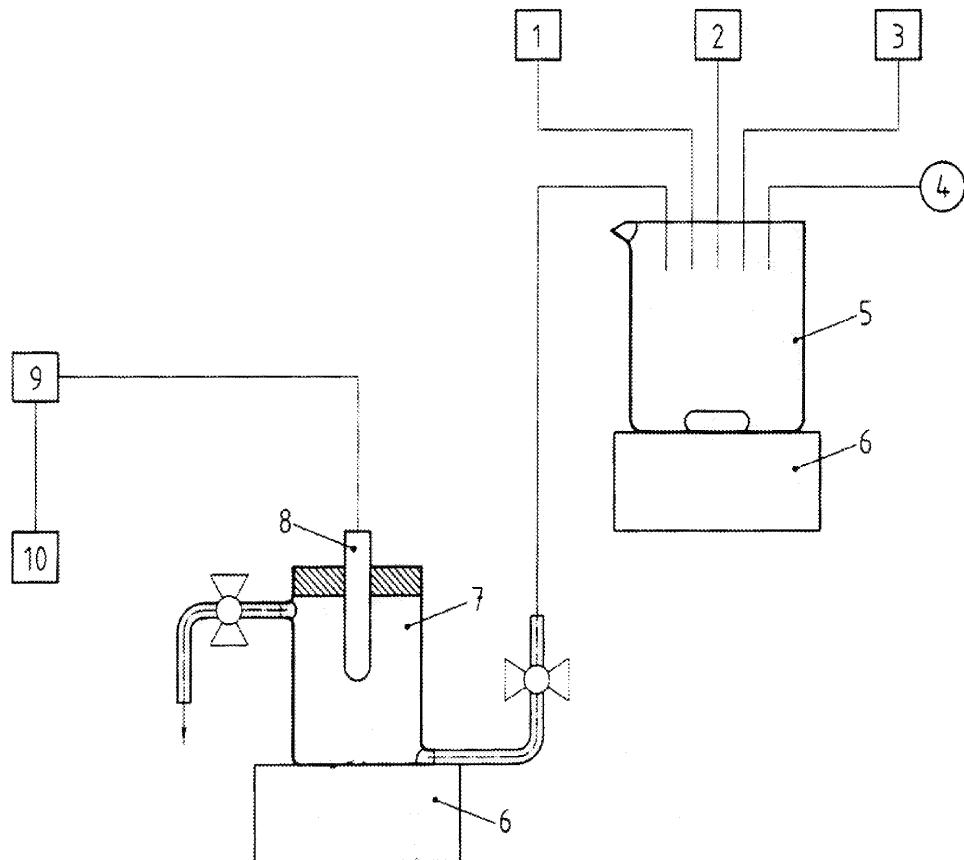
EC_x (concentrazione efficace all'x %): concentrazione che determina un effetto pari all'x % sugli organismi sperimentali in un determinato periodo di esposizione rispetto al controllo. Ad esempio, EC₅₀ è una concentrazione che si ritiene produca un effetto su un endpoint in esame nel 50 % della popolazione esposta nel corso di un determinato periodo di esposizione.

NOEC (no observed effect concentration — concentrazione senza effetti osservabili): concentrazione della sostanza chimica in esame alla quale non si osserva alcun effetto. Nella presente prova, in un determinato periodo di esposizione, la concentrazione che corrisponde alla NOEC non ha alcun effetto statisticamente significativo ($p < 0,05$) rispetto al controllo.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata seguendo il presente metodo di prova.

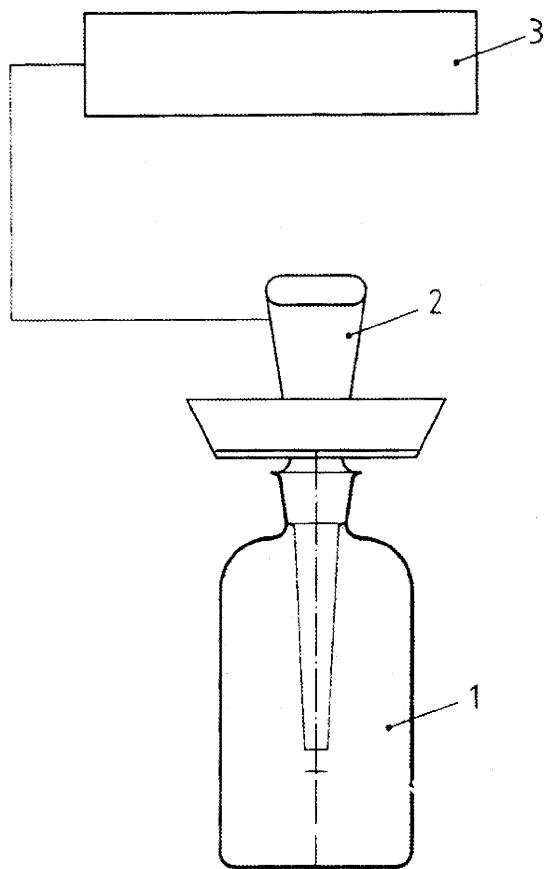
Appendice 2

Figura 1 — Esempi di dispositivi di misurazione



Legenda

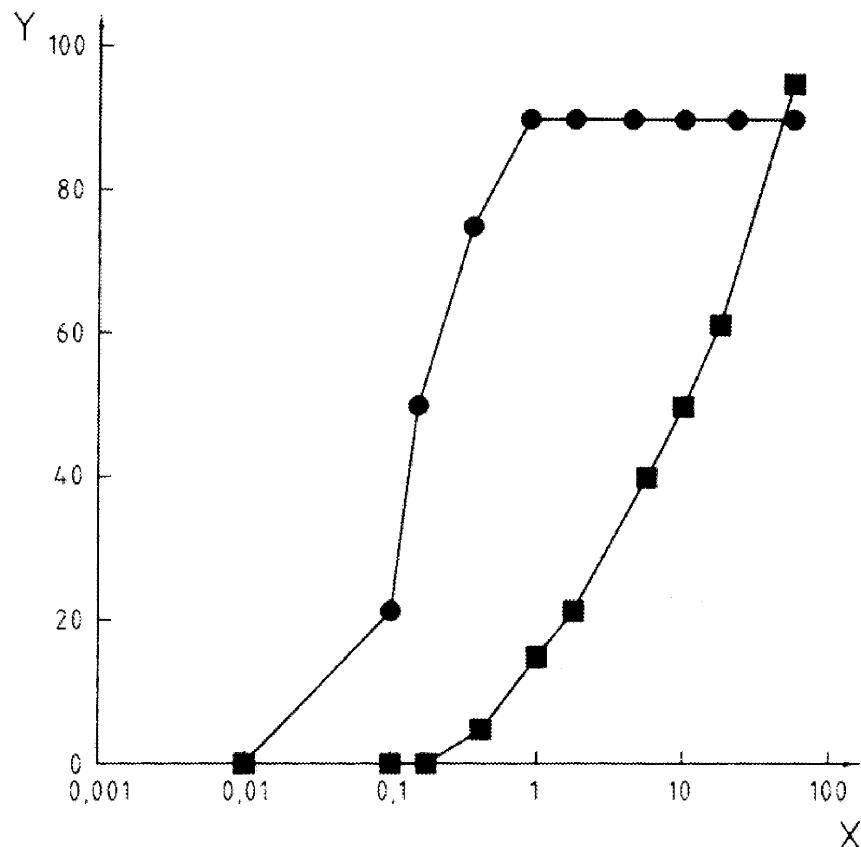
- | | |
|------------------------------|--|
| 1 fanghi attivi | 6 agitatore magnetico |
| 2 mezzo artificiale | 7 cella per la misurazione dell'ossigeno |
| 3 sostanza chimica in esame | 8 elettrodo a ossigeno |
| 4 aria | 9 strumento per la misurazione dell'ossigeno |
| 5 recipiente di miscelazione | 10 dispositivo di registrazione |

*Appendice 3**Figura 2 — Esempio di unità di misurazione, utilizzando una bottiglia per BOD**Legenda*

- 1 recipiente di prova
- 2 elettrodo a ossigeno
- 3 strumento per la misurazione dell'ossigeno

Appendice 4

Figura 3 — Esempi di curve di inibizione



Legenda

X concentrazione di 3,5-diclorofenolo (mg/l)

Y inibizione (%)

■ inibizione della respirazione eterotrofica utilizzando fanghi nitrificanti

● inibizione della nitrificazione utilizzando fanghi nitrificanti»

(5) Il capitolo C.26. è sostituito dal seguente:

«C.26 PROVA DI INIBIZIONE DELLA CRESCITA DI SPECIE DI LEMNA

INTRODUZIONE

- Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 221 (2006). È destinato a valutare la tossicità delle sostanze chimiche nei confronti delle piante acquatiche di acqua dolce del genere *Lemna* (lenticchia d'acqua). Si basa su metodi esistenti (1)(2)(3)(4)(5)(6) ma include le modifiche apportate a questi metodi in modo da tenere conto sia degli ultimi progressi della ricerca sia delle consulenze di esperti su una serie di aspetti fondamentali. Il metodo qui proposto è stato convalidato da una prova interlaboratorio (*ring test*) internazionale (7).

2. Il presente metodo illustra come condurre prove di tossicità su *Lemna gibba* e *Lemna minor*, due specie ampiamente studiate e che sono oggetto delle norme i cui riferimenti sono indicati in precedenza. La tassonomia di *Lemna* spp. è complessa a causa dell'esistenza di numerosi fenotipi. Benché la variabilità genetica di *Lemna* possa influire sulla risposta alle sostanze tossiche, i dati di cui disponiamo attualmente su questa fonte di variabilità sono insufficienti per raccomandare l'utilizzo di un clone specifico nel presente metodo di prova. Occorre rilevare che, sebbene la prova non sia effettuata con colture pure, sono adottate misure in varie fasi della procedura per mantenere al minimo la contaminazione da parte di altri organismi.
3. Sono descritte dettagliatamente le procedure con rinnovo (procedura semistatica e a flusso continuo) e senza rinnovo (procedura statica) della soluzione di prova. In funzione degli obiettivi della prova e dei requisiti normativi si raccomanda di valutare l'uso di metodi semistatici e continui, per esempio per le sostanze che spariscono rapidamente dalla soluzione per volatilizzazione, fotodegradazione, precipitazione o biodegradazione. Ulteriori orientamenti sono contenuti nel riferimento bibliografico (8).
4. L'appendice 1 contiene le definizioni di termini utili ai fini del presente metodo.

PRINCIPIO DELLA PROVA

5. Si allestiscono monoculture di piante del genere *Lemna* a crescita esponenziale con varie concentrazioni della sostanza chimica in esame per un periodo di sette giorni. L'obiettivo della prova è quantificare gli effetti della sostanza chimica sulla crescita vegetativa nel corso di questo periodo, sulla base della valutazione di determinate variabili di misura. Il numero di fronde è la principale variabile di misurazione. Viene misurata almeno un'altra variabile (area totale delle fronde, peso secco o peso fresco), in quanto alcune sostanze chimiche possono avere un effetto più pronunciato su variabili di misurazione diverse dal numero di fronde. Per quantificare gli effetti della sostanza chimica, si confronta la crescita nelle soluzioni di prova con quella che avviene nei controlli e si determina la concentrazione che causa una data percentuale di inibizione della crescita (per esempio 50 %), espressa come EC_x (per esempio EC₅₀).
6. L'endpoint della prova è l'inibizione della crescita, espressa come l'aumento logaritmico della variabile di misurazione (tasso di crescita specifico medio) durante il periodo di esposizione. A partire dai tassi di crescita specifici medi registrati in una serie di soluzioni di prova, si determina la concentrazione che causa una data percentuale di inibizione del tasso di crescita (per esempio 50 %), espressa come E_rC_x (ad esempio E_rC₅₀).
7. Un'altra variabile di risposta utilizzata nel presente metodo di prova è il rendimento, che può essere necessario utilizzare per soddisfare requisiti normativi specifici di alcuni paesi. È definito come la differenza tra il valore delle variabili di misurazione al termine del periodo di esposizione e il valore delle variabili di misurazione all'inizio del periodo di esposizione. A partire dal rendimento registrato in una serie di soluzioni di prova, si determina la concentrazione che causa una data percentuale di inibizione del rendimento (per esempio 50 %), espressa come E_yC_x (ad esempio E_yC₅₀).
8. Si possono inoltre determinare mediante un calcolo statistico la concentrazione minima a cui si osserva un effetto statisticamente significativo (LOEC) e la concentrazione senza effetti osservabili (NOEC).

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA CHIMICA IN ESAME

9. Occorre disporre di un metodo analitico con un'adeguata sensibilità per la quantificazione della sostanza chimica nel mezzo di prova.
10. Le informazioni sulla sostanza chimica in esame che possono essere utili per stabilire le condizioni sperimentali comprendono la formula strutturale, la purezza, l'idrosolubilità, la stabilità in acqua e alla luce, la pK_a, il K_{ow}, la pressione di vapore e la biodegradabilità. L'idrosolubilità e la pressione di vapore possono essere utilizzate per calcolare la costante della legge di Henry, che indica se possono verificarsi perdite significative della sostanza chimica in esame nel corso della prova. Tale calcolo consente di sapere se occorre adottare misure specifiche per tenere sotto controllo le perdite. Quando le informazioni sulla solubilità e la stabilità della sostanza chimica in esame sono incerte, si consiglia di verificarle nelle condizioni sperimentali, ossia nel mezzo di crescita, alla temperatura e con l'illuminazione che si utilizzeranno nella prova.

11. Quando la regolazione del pH del mezzo di prova è particolarmente importante, ossia quando si saggiano metalli o sostanze chimiche idroliticamente instabili, si raccomanda di aggiungere un tampone al mezzo di crescita (cfr. paragrafo 21). Al riferimento (8) sono forniti ulteriori orientamenti per saggiare sostanze chimiche le cui proprietà fisicochimiche rendono difficile la conduzione delle prove.

VALIDITÀ DELLA PROVA

12. Affinché la prova sia valida, il tempo di raddoppio del numero di fronde nei controlli deve essere inferiore a 2,5 giorni (60 ore), che corrisponde approssimativamente ad una moltiplicazione per sette in sette giorni e a un tasso di crescita specifico medio di $0,275 \text{ g}^{-1}$. Utilizzando il mezzo e le condizioni sperimentali descritti nel presente metodo, questo criterio può essere soddisfatto mediante una procedura statica (5), partendo comunque dal principio che può essere soddisfatto anche con prove semistatiche o a flusso continuo. Il calcolo del tempo di raddoppio è illustrato nel paragrafo 49.

SOSTANZA CHIMICA DI RIFERIMENTO

13. La procedura sperimentale può essere verificata saggiano sostanze chimiche di riferimento, come per esempio il 3,5-diclorofenolo utilizzato nella prova interlaboratorio (ring-test) internazionale (7). Si consiglia di effettuare una prova con una sostanza chimica di riferimento almeno due volte l'anno o, qualora la prova sia realizzata con una frequenza inferiore, parallelamente alla determinazione della tossicità della sostanza chimica in esame.

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiatura

14. Tutte le apparecchiature che entrano in contatto con i mezzi di prova devono essere di vetro o di un altro materiale chimicamente inerte. Le apparecchiature di vetro utilizzate per le colture e le prove devono essere sterili e esenti da contaminanti chimici che potrebbero penetrare nel mezzo di prova. I recipienti devono essere sufficientemente ampi da consentire alle fronde delle varie colonie dei recipienti di controllo di crescere senza sovrapporsi fino alla fine della prova. Le radici possono toccare il fondo dei recipienti, ma si consiglia di utilizzare recipienti con una profondità minima di 20 mm e un volume minimo di 100 ml. La scelta dei recipienti non riveste particolare importanza a condizione che si rispettino i suddetti requisiti. Becher di vetro, cristallizzatori o piastre Petri di vetro di dimensioni adeguate si sono dimostrati recipienti adatti. I recipienti di prova devono essere coperti per minimizzare l'evaporazione e la contaminazione accidentale, pur consentendo il ricambio d'aria necessario. Sono indicati recipienti di prova, e in particolare i rispettivi coperchi, che non creano zone d'ombra o alterano le caratteristiche dello spettro luminoso.
15. Le colture e i recipienti di prova non devono essere tenuti insieme; è quindi opportuno utilizzare camere di crescita ambientali, incubatori o stanze separati. L'illuminazione e la temperatura devono essere regolabili e mantenute ad un livello costante (cfr. paragrafi 35-36).

Organismo sperimentale

16. L'organismo utilizzato per questa prova è *Lemna gibba* o *Lemna minor*. L'appendice 2 contiene una breve descrizione delle specie di lenticchia d'acqua che sono state utilizzate per le prove di tossicità. Il materiale vegetale può essere ottenuto da una collezione di colture, da un altro laboratorio o raccolto sul terreno. In quest'ultimo caso, le piante vanno tenute nel mezzo che sarà utilizzato per le prove per almeno otto settimane prima del loro impiego. Le colture di partenza sono prelevate solo da siti chiaramente esenti da fonti evidenti di inquinamento. Se le colture provengono da un altro laboratorio o da una collezione, devono essere tenute nelle stesse condizioni per almeno tre settimane. La fonte del materiale vegetale, nonché la specie e il clone (se noto) utilizzati per la prova devono sempre essere indicati.
17. Occorre utilizzare delle monoculture, chiaramente esenti da contaminazioni da parte di altri organismi come alghe e protozoi. Le piante sane di *L. minor* formano colonie comprendenti da due a cinque fronde, mentre le colonie sane di *L. gibba* possono presentare fino a sette fronde.
18. La qualità e l'uniformità delle piante utilizzate per la prova avranno un impatto significativo sui risultati della stessa e vanno pertanto selezionate con cura. Occorre utilizzare piante giovani, in rapida crescita, prive di lesioni visibili e di parti scolorite (clorosi). Le colture di buona qualità presentano molte colonie con almeno due fronde. Un elevato numero di fronde singole è indizio di stress ambientale, ad esempio per scarsità di nutrienti, per cui materiale vegetale proveniente da colture con queste caratteristiche non deve essere utilizzato per le prove.

Colture

19. Per ridurre la frequenza delle operazioni di manutenzione (per esempio, se per un certo periodo non si prevedono prove su *Lemna*), le colture possono essere conservate ad un'illuminazione e una temperatura ridotte (4-10 °C). Informazioni dettagliate sulle tecniche di coltura sono riportate nell'appendice 3. In caso di segni evidenti di contaminazione da parte di alghe o altri organismi è opportuno sterilizzare superficialmente un sottocampione di fronde di *Lemna* e trasferirlo in un terreno nuovo (cfr. appendice 3). In tal caso la parte restante della coltura contaminata va eliminata.
20. Almeno sette giorni prima della prova, un numero sufficiente di colonie è trasferito, in condizioni asettiche, in un mezzo sterile nuovo ed è coltivato per 7-10 giorni nelle condizioni previste per la prova.

Mezzo di prova

21. I vari mezzi raccomandati per *Lemna minor* e *Lemna gibba* sono descritti di seguito. L'aggiunta di un tampone di pH nel mezzo di prova (MOPS (acido 4-morfolinopropanosulfonico, n. CAS 1132-61-2) nel mezzo per *L. minor* e NaHCO₃ nel mezzo per *L. gibba*) va ponderata con attenzione se si sospetta che possa interagire con la sostanza chimica in esame e condizionare l'espressione della sua tossicità. È possibile impiegare anche il mezzo di Steinberg (9), a condizione che siano rispettati i criteri di validità.
22. Per le colture e le prove con *L. minor* si raccomanda l'uso di una versione modificata del mezzo di crescita della norma svedese (SIS). La composizione di questo mezzo è riportata nell'appendice 4.
23. Per le colture e le prove con *L. gibba* si raccomanda l'uso del mezzo di crescita 20X — AAP, descritto nell'appendice 4.
24. Per *L. minor* è adatto anche il mezzo di Steinberg, descritto nell'appendice 4, che può essere utilizzato anche per *L. gibba* a condizione che siano rispettati i criteri di validità.

Soluzioni di prova

25. In genere le soluzioni di prova sono preparate mediante diluizione di una soluzione madre. Le soluzioni madre della sostanza chimica in esame sono solitamente preparate sciogliendo detta sostanza nel mezzo di crescita.
26. La concentrazione più elevata della sostanza chimica in esame non deve di norma superare il limite di solubilità della sostanza stessa in acqua, nelle condizioni di prova. Va rilevato, tuttavia, che le specie di *Lemna* galleggiano in superficie e rischiano di essere esposte a sostanze che si accumulano nell'interfaccia acqua-aria (per esempio sostanze a bassa idrosolubilità, idrofobe o tensioattivi). In tali circostanze l'esposizione risulterà da materiale diverso da quello presente nella soluzione, quindi le concentrazioni di prova potrebbero, in funzione delle caratteristiche della sostanza chimica in esame, essere superiori al limite di idrosolubilità. Per le sostanze chimiche a bassa idrosolubilità potrà essere necessario preparare una soluzione madre concentrata o disperdere la sostanza chimica utilizzando un solvente o un disperdente organico, al fine di agevolare l'aggiunta di quantità esatte della sostanza chimica in esame nel mezzo di prova e favorirne la dispersione e la dissoluzione. Occorre fare il possibile per evitare di utilizzare materiali di questo tipo. L'uso di solventi o disperdenti ausiliari non deve causare alcuna fitotossicità. Tra i solventi di uso comune che non provocano fitotossicità a concentrazioni fino a 100 µl/1 rientrano, ad esempio, l'acetone e il dimetilformammide. Se si utilizza un solvente o un disperdente, la sua concentrazione finale deve essere comunicata e tenuta al minimo (ossia ≤ 100 µl/1); deve inoltre essere identica in tutti i recipienti trattati e di controllo. Per ulteriori informazioni sull'uso dei disperdenti si veda il riferimento (8).

Gruppi di prova e gruppi di controllo

27. Per determinare le concentrazioni sperimentali adeguate è utile conoscere già la tossicità della sostanza chimica in esame nei confronti di *Lemna*, per esempio sulla base di precedenti prove a diversi intervalli di concentrazione. Nella prova di tossicità definitiva di norma si devono scegliere almeno cinque concentrazioni in progressione geometrica. Di preferenza il fattore di separazione tra le concentrazioni non deve essere superiore a 3,2, ma si può utilizzare un valore più elevato se la curva concentrazione-risposta è piatta. L'uso di un numero di concentrazioni inferiore a cinque va giustificato. Occorre impiegare almeno tre repliche per ogni concentrazione di prova.

28. Nel fissare l'intervallo delle concentrazioni di prova (per le prove di determinazione dell'intervallo e/o la prova di tossicità definitiva), occorre tenere presente quanto segue:
- per determinare la EC_x, le concentrazioni di prova devono situarsi intorno al valore EC_x per garantire un intervallo di confidenza adeguato. Per esempio, quando si valuta la EC₅₀, la concentrazione di prova più alta deve essere superiore al valore EC₅₀. Se il valore EC₅₀ si situa fuori dall'intervallo delle concentrazioni in esame i relativi intervalli di confidenza saranno ampi, il che rischia di impedire una valutazione corretta dell'adeguamento statistico del modello;
 - quando la finalità è valutare la LOEC/NOEC, la concentrazione di prova più bassa deve essere bassa a sufficienza affinché la crescita del gruppo trattato non sia significativamente inferiore a quella dei controlli. Inoltre la concentrazione di prova più alta deve essere alta a sufficienza affinché la crescita sia significativamente inferiore a quella dei controlli. In caso contrario, occorrerà ripetere la prova utilizzando un intervallo di concentrazione diverso (a meno che la concentrazione più alta coincida con il limite di solubilità o con la concentrazione limite massima richiesta, per esempio 100 mg/1).
29. Ogni prova deve prevedere controlli con mezzo nutriente, numero di fronde e colonie, condizioni ambientali e procedure (come i recipienti di prova) identici a quelli dei recipienti trattati, ma senza la sostanza chimica in esame. Qualora si utilizzi un solvente o un disperdente ausiliario, la prova deve includere un controllo supplementare con il solvente/disperdente alle stesse concentrazioni utilizzate nei recipienti contenenti la sostanza chimica in esame. Il numero dei recipienti di controllo identici, e degli eventuali recipienti con solvente, deve essere almeno pari al numero dei recipienti utilizzati per ciascuna concentrazione di prova, e idealmente il doppio di tale numero.
30. Se la determinazione della NOEC non è necessaria, la prova può essere modificata in modo da aumentare il numero di concentrazioni e ridurre il numero di repliche per concentrazione. Tuttavia le repliche dei controlli devono essere almeno tre.

Esposizione

31. Si prelevano colonie, composte da 2 a 4 fronde visibili, dalle colture dell'inoculo e si distribuiscono a caso nei recipienti di prova in condizioni asettiche. Ciascun recipiente di prova deve contenere complessivamente da 9 a 12 fronde. Il numero di fronde e di colonie deve essere uguale in ciascun recipiente. L'esperienza acquisita con questo metodo e i dati ottenuti con la prova interlaboratorio (*ring-test*) indicano che bastano tre repliche per trattamento (con 9 - 12 fronde iniziali per replica) per individuare differenze di crescita tra i trattamenti dell'ordine del 4 % - 7 % per l'inibizione calcolata in base al tasso di crescita e del 10 % - 15 % per l'inibizione calcolata in base al rendimento (7).
32. La disposizione dei recipienti di prova nell'incubatore deve essere casuale per ridurre al minimo l'influenza delle differenze spaziali in termini di intensità luminosa o termica. È inoltre necessario cambiare la posizione dei recipienti, per blocchi o in modo casuale, dopo le osservazioni (o più spesso).
33. Se una prova di stabilità preliminare indica che nel corso della prova (7 giorni) la concentrazione della sostanza chimica in esame non può essere mantenuta (ossia la concentrazione misurata diminuisce più dell'80 % della concentrazione misurata inizialmente), si raccomanda di impiegare una procedura sperimentale semistatica. In tal caso, occorre esporre le colonie a soluzioni di prova e di controllo nuove almeno due volte durante la prova (per esempio, il 3° e il 5° giorno). La frequenza dell'esposizione al mezzo fresco dipenderà dalla stabilità della sostanza chimica in esame; una frequenza più elevata può essere necessaria per mantenere concentrazioni pressoché costanti nel caso di sostanze chimiche ad elevata volatilità o instabilità. In alcune circostanze può essere necessario ricorrere a una procedura a flusso continuo (8)(10).
34. L'esposizione mediante un'applicazione fogliare (polverizzazione) non è contemplata nel presente metodo di prova; per informazioni in proposito si veda il riferimento bibliografico (11).

Condizioni di incubazione

35. Occorre fornire un'illuminazione continua a fluorescenza bianca, calda o fredda, al fine di ottenere un'intensità luminosa compresa tra 85 e 135 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, misurata in una radiazione fotosinteticamente attiva (da 400 a 700 nm) in punti situati a una distanza dalla fonte luminosa identica a quella delle fronde di *Lemna* (intensità equivalente a 6 500-10 000 lux). Eventuali differenze rispetto all'intensità luminosa prescelta non devono superare, in tutta la zona in cui è condotta la prova, $\pm 15\%$. Il metodo di rilevamento e misurazione della luce, in particolare il tipo di sensore, inciderà sul valore misurato. I sensori sférici (che rilevano la luce proveniente da tutti gli angoli situati sopra e sotto il piano di misurazione) e i sensori cosinusoidali (che rilevano la luce da tutti gli angoli situati sopra il piano di misurazione) sono preferibili ai sensori unidirezionali e indicheranno valori più elevati per una fonte luminosa multipla come quella qui descritta.

36. La temperatura nei recipienti di prova deve essere mantenuta a 24 ± 2 °C. Il pH del mezzo di controllo non deve aumentare di oltre 1,5 unità nel corso della prova. Uno scarto superiore a 1,5 unità non invalida tuttavia la prova se il rispetto dei criteri di validità può essere dimostrato. In determinati casi occorre prestare particolare attenzione alle variazioni del pH, in particolare quando si saggiano sostanze chimiche instabili e metalli. Per ulteriori indicazioni al riguardo, si veda il riferimento bibliografico (8).

Durata

37. La prova termina sette giorni dopo il trasferimento delle piante nei recipienti di prova.

Misurazioni e determinazioni analitiche

38. All'inizio della prova si conta e si registra il numero di fronde contenute nei recipienti di prova, avendo cura di contare tutte le fronde emergenti chiaramente visibili. Il numero di fronde che presentano un aspetto normale o anomalo deve essere determinato all'inizio della prova, almeno una volta ogni tre giorni nel periodo di esposizione (ossia almeno due volte nell'arco dei sette giorni) e alla fine della prova. Occorre registrare anche le modifiche riscontrate nello sviluppo delle piante per quanto riguarda, per esempio, la dimensione e l'aspetto delle fronde, i segni di necrosi, clorosi e gibbosità, la frammentazione delle colonie o la diminuzione della loro galleggiabilità, nonché la lunghezza e l'aspetto delle radici. È anche necessario registrare le caratteristiche salienti del mezzo di prova (per esempio la presenza di materiale in sospensione, lo sviluppo di alghe nei recipienti di prova).
39. Durante le prova, oltre a determinare il numero di fronde, si misurano gli effetti della sostanza chimica in esame su una o più delle seguenti variabili:
- (i) area totale delle fronde,
 - (ii) peso secco,
 - (iii) peso fresco.
40. L'area totale delle fronde presenta il vantaggio di potere essere determinata per ciascun recipiente di prova e di controllo all'inizio, durante e al termine della prova. Il peso secco o fresco è determinato all'inizio della prova, utilizzando un campione della coltura di inoculo rappresentativo del materiale impiegato per avviare la prova, e alla fine della prova, con il materiale vegetale di ciascun recipiente di prova e di controllo. Se l'area delle fronde non è misurata, il peso secco è da preferirsi al peso fresco.
41. L'area totale delle fronde, il peso secco e il peso fresco possono essere determinati nel modo seguente:
- (i) *area totale delle fronde*: l'area totale delle fronde di tutte le colonie può essere determinata mediante l'analisi dell'immagine. Con una videocamera si rileva la sagoma del recipiente di prova e delle piante (ponendo il recipiente su un illuminatore) e si digitalizza l'immagine ottenuta. A partire da una calibrazione realizzata con forme piane di superficie conosciuta si determina l'area totale delle fronde di ciascun recipiente di prova. Occorre evitare attentamente le interferenze causate dal bordo del recipiente. Un metodo più elaborato consiste nel fotocopiare i recipienti di prova e le piante, ritagliare la risultante sagoma delle colonie e determinarne la superficie mediante un analizzatore della superficie fogliare oppure carta millimetrata. Si possono utilizzare anche altre tecniche (per esempio il quoziente del peso della sagoma ritagliata nella carta per il peso di un pezzo di carta di superficie nota);
 - (ii) *peso secco*: tutte le colonie di ciascun recipiente di prova sono prelevate e sciacquate con acqua distillata o deionizzata; sono poi poste su carta assorbente, che ne assorbe l'acqua in eccesso, e asciugate a 60 °C fino a ottenere un peso costante. Eventuali frammenti di radici devono essere inclusi. Il peso secco deve essere espresso con una precisione di almeno 0,1 mg;
 - (iii) *peso fresco*: tutte le colonie sono trasferite in tubi di polistirolo (o altro materiale inerte) tarati, con fondo arrotondato e bucherellato (fori di 1 mm). I tubi sono in seguito centrifugati a 3 000 gpm per 10 minuti a temperatura ambiente. I tubi contenenti le colonie così asciugate sono nuovamente pesati e il preso fresco è calcolato per sottrazione della tara del tubo.

Frequenza delle misurazioni e delle determinazioni analitiche

42. Se si applica una procedura statica, il pH di ciascun recipiente trattato deve essere misurato all'inizio e alla fine della prova. Se la procedura è semistatica, il pH deve essere misurato in ciascun lotto di soluzione di prova "nuova" prima di ogni rinnovo, così come nelle soluzioni "usate" corrispondenti.

43. L'intensità luminosa è misurata nella camera di crescita, nell'incubatore o nella stanza in punti situati a una distanza dalla fonte luminosa identica a quella delle fronde di *Lemna*. La misurazione deve essere effettuata almeno una volta nel corso della prova. La temperatura del mezzo è registrata almeno una volta al giorno in un recipiente appositamente allestito a questo scopo e conservato alle stesse condizioni degli altri nella camera di crescita, nell'incubatore o nella stanza.
44. Durante la prova, le concentrazioni della sostanza chimica in esame sono determinate a congrui intervalli. Nelle prove statiche, le concentrazioni devono essere rilevate almeno all'inizio e alla fine della prova.
45. Nelle prove semistatiche in cui si presume che la concentrazione della sostanza chimica in esame non si mantenga entro un intervallo di $\pm 20\%$ della concentrazione nominale è necessario analizzare tutte le soluzioni di prova appena vengono preparate e al momento del rinnovo (cfr. paragrafo 33). Tuttavia, per le prove in cui la concentrazione della sostanza chimica in esame misurata inizialmente non si situa in un intervallo di $\pm 20\%$ del valore nominale, ma in cui un numero sufficiente di indizi dimostra che le concentrazioni iniziali sono ripetibili e stabili (ossia nell'intervallo tra 80 % e 120 % della concentrazione iniziale), le determinazioni chimiche possono limitarsi solo alla concentrazione di prova più alta e a quella più bassa. In ogni caso, la determinazione delle concentrazioni della sostanza chimica in esame prima del rinnovo deve essere effettuata su una sola replica per ciascuna concentrazione di prova (o in un recipiente in cui è stato mescolato il contenuto di tutti i recipienti trattati in modo identico).
46. Nel caso delle prove con procedura a flusso continuo si può applicare uno schema di campionamento identico a quello descritto per le prove semistatiche, con un'analisi all'inizio, a metà e al termine della prova, ma senza l'analisi delle soluzioni "usate", che in questo caso non è necessaria. In questo tipo di prova deve essere controllato giornalmente la velocità di flusso del diluente e della sostanza chimica in esame oppure della soluzione madre della sostanza chimica in esame.
47. Se è comprovato che la concentrazione della sostanza chimica in esame si è mantenuta nel corso dell'intera prova entro un intervallo di $\pm 20\%$ della concentrazione nominale o della concentrazione misurata all'inizio, l'analisi dei risultati può basarsi sui valori nominali o quelli misurati all'inizio. Se lo scarto rispetto alla concentrazione nominale o quella misurata inizialmente è superiore a $\pm 20\%$, l'analisi dei risultati dovrà basarsi sulla media geometrica della concentrazione durante l'esposizione o su modelli che descrivono la diminuzione della concentrazione della sostanza chimica in esame (8).

Prova limite

48. In determinate circostanze, per esempio quando una prova preliminare indica che la sostanza chimica in esame non ha effetti tossici in concentrazioni fino a 100 mg/l oppure fino al suo limite di solubilità nel mezzo di prova (si scelga il valore più basso), può essere svolta una prova limite che consiste nel confrontare le risposte di un gruppo di controllo e di un gruppo trattato (a una concentrazione di 100 mg/l o pari al limite di solubilità della sostanza chimica in esame nel mezzo di prova). È vivamente raccomandato che l'assenza di tossicità sia corroborata da un'analisi della concentrazione di esposizione. Tutti i criteri di validità e le condizioni sperimentali descritti precedentemente si applicano alla prova limite, eccezion fatta per il numero delle repliche trattate, che deve essere raddoppiato. La crescita nel gruppo di controllo e nel gruppo trattato può essere analizzata mediante una prova statistica di confronto delle medie, per esempio un test t di Student.

DATI E RELAZIONI

Tempo di raddoppio

49. Per determinare il tempo di raddoppio (T_d) del numero di fronde e verificare se lo studio rispetta questo criterio di validità (paragrafo 12), si applica la formula seguente ai dati risultanti dai controlli:

$$T_d = \ln 2 / \mu$$

in cui μ è il tasso di crescita specifico medio determinato secondo quanto indicato nei paragrafi 54-55.

Variabili di risposta

50. La finalità di questa prova è di determinare gli effetti della sostanza chimica in esame sulla crescita vegetativa di *Lemna*. Il presente metodo di prova descrive due variabili di risposta, in quanto negli Stati membri esistono preferenze e requisiti normativi diversi. Affinché i risultati della prova siano accettabili in tutti gli Stati membri, gli effetti devono essere valutati in funzione di entrambe le variabili di risposta (a) e (b) definite di seguito:
- (a) *tasso di crescita specifico medio*, calcolato in base al cambiamento logaritmico del numero di fronde e, in aggiunta, all'evoluzione logaritmica di un altro parametro di misurazione (area totale delle fronde, peso secco o peso fresco) nel corso del tempo (espresso in giorni) nei gruppi di controllo e in ciascun gruppo trattato. Talvolta viene definito "tasso di crescita relativo" (12);
 - (b) *rendimento*, calcolato in base ai cambiamenti del numero di fronde e a un altro parametro aggiuntivo di misurazione (area totale delle fronde, peso secco o peso fresco) nei gruppi di controllo e in ciascun gruppo trattato fino alla fine della prova.
51. Occorre rilevare che i valori della tossicità calcolati utilizzando queste due variabili di risposta non sono comparabili, per cui occorre tenere conto di questa differenza al momento di utilizzare i risultati della prova. I valori dell' EC_x basati sul tasso di crescita specifico medio (E_yC_x) saranno generalmente superiori a quelli basati sul rendimento (E_yC_x), se le condizioni del presente metodo di prova sono rispettate, per via del fondamento matematico dei due approcci. Questa differenza è dovuta solo al calcolo matematico e non va considerata una differenza di sensibilità tra le due suddette variabili di risposta. Il concetto di tasso di crescita specifico medio si basa sull'andamento generale della crescita esponenziale delle lenticchie d'acqua in colture non soggette a limitazioni; la tossicità è valutata in base agli effetti sul tasso di crescita, senza tenere conto del livello assoluto del tasso di crescita specifico dei controlli, della curva discendente concentrazione-risposta o della durata della prova. I risultati basati sul rendimento dipendono invece da tutte queste altre variabili. L' E_yC_x dipende dal tasso di crescita specifico della specie di lenticchia d'acqua utilizzata in ogni prova e dal tasso di crescita specifico massimo che può variare da una specie all'altra, se non addirittura da un clone all'altro. Questa variabile non deve essere utilizzata per confrontare la sensibilità alle sostanze tossiche di specie diverse né di cloni diversi di lenticchie d'acqua. Pur essendo preferibile, da un punto di vista scientifico, stimare la tossicità in base al tasso di crescita specifico medio, per soddisfare i requisiti normativi vigenti in alcuni paesi il presente metodo di prova include anche la stima basata sul rendimento.
52. La stima della tossicità deve basarsi sul numero di fronde e su un'altra variabile di misura (area totale delle fronde, peso secco o peso fresco), perché alcune sostanze chimiche possono avere un effetto più marcato su una variabile diversa dal numero di fronde. Questo effetto potrebbe passare inosservato se il calcolo si basa unicamente sul numero di fronde.
53. In una tabella si registrano il numero di fronde e qualsiasi altra variabile di risposta misurata (area totale delle fronde, peso secco o peso fresco), insieme alle concentrazioni della sostanza chimica in esame rilevate in ogni misurazione. Le analisi successive, per esempio per stimare la LOEC, la NOEC o l' EC_x devono basarsi sui valori di ciascuna replica e non sulle medie calcolate di ciascun gruppo trattato.

Tasso di crescita specifico medio

54. Il tasso di crescita specifico medio per un determinato periodo è calcolato in funzione dell'aumento logaritmico delle variabili di crescita — numero di fronde e un'altra variabile di misura (area totale delle fronde, peso secco o peso fresco) — utilizzando la formula riportata qui di seguito per ciascuna replica dei gruppi di controllo e dei gruppi trattati:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

dove:

- μ_{i-j} è il tasso di crescita specifico medio dal momento i al momento j,
- N_i è la variabile di misurazione nel recipiente di prova o di controllo nel momento i,

- N_j è la variabile di misurazione nel recipiente di prova o di controllo nel momento j ,
- t è il periodo di tempo tra i e j .

Per ciascuno gruppo trattato e di controllo, calcolare il valore medio del tasso di crescita e le relative stime della varianza.

55. Occorre calcolare il tasso di crescita specifico medio per l'intero periodo di prova (i momenti "i" e "j" nella formula suindicata corrispondono rispettivamente all'inizio e alla fine della prova). Per ciascuna concentrazione dei gruppi trattati e di controllo, calcolare il valore medio del tasso di crescita specifico e le rispettive stime della varianza. Occorre inoltre valutare il tasso di crescita in ogni sezione della prova per verificare gli effetti della sostanza chimica in esame durante il periodo di esposizione (per esempio, analizzando le curve di crescita dopo trasformazione logaritmica). Una differenza importante tra il tasso di crescita sezione per sezione e il tasso di crescita medio sta ad indicare l'esistenza di uno scarto rispetto alla crescita esponenziale costante, il che richiede un attento esame delle curve di crescita. In tal caso, un approccio prudente consiste nel confrontare i tassi di crescita specifici delle colture trattate durante il periodo di inibizione massima con quelli dei controlli nello stesso periodo.
56. La percentuale di inibizione del tasso di crescita (I_r) può essere successivamente calcolata per ciascuna concentrazione di prova (gruppo trattato) secondo la formula seguente:

$$\% I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

dove:

- $\% I_r$: è la percentuale di inibizione del tasso di crescita specifico medio,
- μ_C : è il valore medio di μ nel gruppo di controllo,
- μ_T : è il valore medio di μ nel gruppo trattato.

Rendimento

57. Gli effetti sul rendimento sono determinati in funzione di due variabili di misurazione: il numero di fronde e un'altra variabile (area totale delle fronde, peso secco o peso fresco), per ciascun recipiente di prova all'inizio e al termine della prova. Per quanto riguarda il peso secco o il peso fresco, la biomassa di partenza è determinata a partire da un campione di fronde prelevato dallo stesso lotto utilizzato per inoculare i recipienti di prova (cfr. paragrafo 20). Per ciascuna concentrazione di prova e di controllo occorre calcolare un valore medio di rendimento nonché le stime della varianza. Per ogni gruppo trattato la percentuale media di inibizione del rendimento ($\% I_y$) può essere calcolata secondo la formula seguente:

$$\% I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

dove:

- $\% I_y$ è la percentuale di riduzione del rendimento,
- b_c è la biomassa finale meno la biomassa di partenza del gruppo di controllo,
- b_T è la biomassa finale meno la biomassa di partenza del gruppo trattato.

Tracciato delle curve concentrazione-risposta

58. Occorre tracciare curve concentrazione-risposta che raffigurano la percentuale d'inibizione media della variabile di risposta (I_r oppure I_y calcolate come indicato nei paragrafi 56 o 57) e il logaritmo della concentrazione della sostanza chimica in esame.

Stima dell' EC_x

59. Le stime dell' EC_x (ad esempio, l' EC_{50}) devono essere basate sia sul tasso di crescita specifico medio ($E_r C_x$) sia sul rendimento ($E_y C_x$), che devono, a loro volta, basarsi sul numero di fronde e su un'altra variabile di misurazione (area totale delle fronde, peso secco o peso fresco), in quanto alcune sostanze chimiche in esame producono effetti diversi sul numero di fronde e su altre variabili di misurazione. I parametri di tossicità ricercati corrispondono pertanto a quattro valori di EC_x per ciascun livello di inibizione x calcolato: $E_r C_x$ (numero di fronde); $E_y C_x$ (area totale delle fronde, peso secco o peso fresco); $E_r C_x$ (numero di fronde); e $E_y C_x$ (area totale delle fronde, peso secco o peso fresco).

Procedure statistiche

60. L'obiettivo consiste nel descrivere in maniera quantitativa, mediante un'analisi della regressione, la relazione concentrazione-risposta. È possibile utilizzare una regressione lineare ponderata, preceduta da una trasformazione di linearizzazione dei dati di risposta — per esempio in unità probit, logit o Weibull (13) —, ma è preferibile applicare metodi di regressione non lineare in quanto tengono conto meglio delle inevitabili irregolarità dei dati e degli scarti rispetto alle distribuzioni regolari. Vicine allo zero o all'inibizione totale, queste irregolarità possono essere amplificate dalla trasformazione e interferire con l'analisi (13). Si fa presente che i metodi analitici standard che utilizzano le trasformazioni probit, logit, o Weibull si applicano a dati quantali (per esempio, mortalità o sopravvivenza) e devono quindi essere modificati per poter essere utilizzati con i dati relativi alla crescita o al rendimento. Per le procedure che consentono di determinare i valori dell' EC_x a partire da dati continui si vedano i riferimenti (14)(15)(16).
61. Per ciascuna variabile di risposta da analizzare, occorre utilizzare la relazione concentrazione-risposta per stimare valori puntuali dell' EC_x . Laddove possibile si determinano i limiti di confidenza a 95 % per ogni stima. La corrispondenza dei dati che descrivono gli effetti rispetto al modello di regressione deve essere valutata graficamente o con metodi statistici. L'analisi della regressione deve essere effettuata basandosi sulle risposte rilevate in ogni replica e non sulle medie dei gruppi trattati.
62. Le stime dell' EC_{50} e gli intervalli di confidenza possono essere ottenuti anche mediante interpolazione lineare con bootstrapping (17), se i modelli o i metodi di regressione disponibili non sono adatti ai dati.
63. Per stimare la LOEC, e quindi la NOEC, è necessario paragonare le medie dei gruppi trattati mediante tecniche di analisi della varianza (ANOVA). La media di ogni concentrazione deve poi essere confrontata con la media dei controlli ricorrendo a un metodo adeguato di comparazione multipla o di analisi della tendenza. A questo proposito possono essere utili i test di Dunnett o di Williams (18)(19)(20)(21). È necessario valutare se l'ipotesi di omogeneità della varianza dell'ANOVA è fondata, valutazione che può essere effettuata graficamente o tramite una prova formale (22), ad esempio i test di Levene o di Bartlett. Se l'ipotesi dell'omogeneità della varianza non si conferma, può essere talvolta utile correggere i dati mediante una trasformazione logaritmica. Se l'eterogeneità della varianza è estrema e non può essere corretta mediante una trasformazione, si prenderanno in considerazione metodi di analisi della tendenza come, ad esempio, i test di tendenza regressivi di Jonckheere. Il riferimento bibliografico (16) fornisce ulteriori orientamenti sulla determinazione della NOEC.
64. Alcuni sviluppi scientifici recenti hanno portato i ricercatori ad auspicare l'abbandono della nozione di NOEC a vantaggio di stime puntuali dell' EC_x basate sulla regressione. Per questa prova su *Lemna* non è stato definito alcun valore appropriato di x. Tuttavia un intervallo da 10 % a 20 % sembra appropriato (in funzione della variabile di risposta scelta) e nella relazione è preferibile riportare sia l' EC_{10} sia l' EC_{20} .

Relazioni

65. La relazione sulla prova deve includere le informazioni indicate di seguito.

Sostanza chimica in esame:

- stato fisico e proprietà fisico-chimiche, compreso il limite di solubilità in acqua,
- dati di identificazione chimica (per esempio il numero CAS), compresa la purezza (impurità).

Specie sperimentali:

- nome scientifico, clone (se noto) e provenienza.

Condizioni sperimentali:

- procedura sperimentale utilizzata (statica, semi-statica o a flusso continuo),
- data di inizio e durata della prova,
- mezzo di prova,
- descrizione del disegno sperimentale: recipienti e coperchi, volumi delle soluzioni, numero di colonie e di fronde per recipiente all'inizio della prova,
- concentrazioni di prova (nominali e misurate, in funzione delle esigenze), numero di repliche per concentrazione,
- metodi di preparazione delle soluzioni madre e delle soluzioni di prova, ivi compreso l'uso di eventuali solventi o disperdenti,
- temperatura nel corso della prova,
- fonte luminosa, intensità luminosa e omogeneità,
- valori del pH dei mezzi di prova e di controllo,
- concentrazioni della sostanza chimica in esame e rispettivo metodo di analisi, con i dati appropriati per la valutazione della qualità del metodo (studi di convalida, scarti tipo o intervalli di confidenza delle analisi),
- metodi di determinazione del numero di fronde e di altre variabili di misurazione, per esempio peso secco, peso fresco o area delle fronde,
- qualsiasi differenza rispetto al presente metodo di prova.

Risultati:

- dati grezzi: numero di fronde e altre variabili di misurazione in ciascun recipiente di prova e di controllo per ciascuna osservazione e analisi,
- medie e scarti tipo per ciascuna variabile di misurazione,
- curve di crescita per ciascuna concentrazione (si raccomanda la trasformazione logaritmica della variabile di misurazione, si veda il paragrafo 55);
- tempo di raddoppio/tasso di crescita nel controllo sulla base del numero di fronde,
- calcolo delle variabili di risposta per ciascuna replica trattata, con valore medio e coefficiente di variazione delle repliche,
- rappresentazione grafica della relazione concentrazione/effetto,
- stime degli endpoint tossici per le variabili di risposta: per esempio EC₅₀, EC₁₀, EC₂₀, e relativi intervalli di confidenza. Se calcolate, la LOEC e/o la NOEC e i metodi statistici utilizzati per determinarle,
- se è stato praticato un test ANOVA, la portata dell'effetto individuato (per esempio, la differenza meno significativa),
- eventuali stimoli della crescita osservati in qualsiasi gruppo trattato,
- eventuali segni di fitotossicità e osservazioni delle soluzioni di prova,
- discussione dei risultati, comprese le eventuali ripercussioni sui risultati dovute alle differenze rispetto al presente metodo di prova.

BIBLIOGRAFIA

- (1) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.
- (2) US EPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., "Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp.
- (3) AFNOR — Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.
- (4) SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).
- (5) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 — 120 pp.
- (6) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.
- (7) Sims I., Whitehouse P. and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.
- (8) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (9) International Organisation for Standardisation. ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test.
- (10) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.
- (11) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353 — 359.
- (12) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.
- (13) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19, 713-718.
- (14) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157-167.
- (15) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.
- (16) OECD. (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (17) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The IC_p approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

-
- (18) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, 1096-1121.
 - (19) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.
 - (20) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103-117.
 - (21) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 519-531.
 - (22) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.
-

Appendice 1

Definizioni

Ai fini del presente metodo di prova si utilizzano le definizioni e le abbreviazioni seguenti.

Biomassa: peso secco della materia vivente presente in una popolazione. In questa prova la biomassa è misurata indirettamente, di norma mediante conteggio delle fronde e l'area delle fronde, quindi l'uso del termine "biomassa" si riferisce anche a queste misurazioni indirette.

Clone: organismo o cellula ottenuto a partire da un singolo individuo per riproduzione asessuata. Gli individui dello stesso clone sono pertanto geneticamente identici.

Clorosi: ingiallimento del tessuto delle fronde.

Colonia: aggregato di fronde madri e figlie (di norma da due a quattro) attaccate le une alle altre. Talvolta denominata "pianta".

Concentrazione minima alla quale si osserva un effetto statisticamente significativo (LOEC — Lowest Observed Effect Concentration): la concentrazione più bassa saggistica di una sostanza alla quale si osserva un effetto di riduzione statisticamente significativo della crescita ($p < 0,05$) rispetto al controllo, nell'arco di un periodo di esposizione definito. Tutte le concentrazioni di prova superiori alla LOEC, tuttavia, devono avere un effetto dannoso uguale o superiore a quello osservato per la LOEC. Quando queste due condizioni non possono essere soddisfatte occorre fornire una spiegazione dettagliata per spiegare come è stata scelta la LOEC (e di conseguenza la NOEC).

Concentrazione senza effetti osservati (NOEC — No Observed Effect Concentration): concentrazione di prova immediatamente inferiore alla LOEC.

Crescita: aumento della variabile di misurazione, per esempio il numero di fronde, il peso secco, il peso umido o l'area delle fronde durante il periodo di prova.

EC_x: concentrazione della sostanza chimica in esame disciolta nel mezzo di prova che determina una riduzione dell'x % (per esempio, 50 %) della crescita di *Lemna* entro un periodo di esposizione definito (che deve essere esplicitato se diverso dalla durata totale o normale della prova). Per indicare in modo inequivoco se il valore EC si riferisce al tasso di crescita o al rendimento si utilizzano le abbreviazioni "E_rC" per il tasso di crescita e "E_yC" per il rendimento, seguite dalla variabile di misurazione utilizzata, ad esempio E_rC (numero di fronde).

Endpoint della prova: indica il fattore generale che sarà modificato, rispetto al controllo, dalla sostanza chimica in esame. In questo metodo di prova l'endpoint è l'inibizione della crescita che può essere espressa da più variabili di risposta dedotte da una o più variabili di misurazione.

Fenotipo: caratteristiche osservabili di un organismo, determinate dall'interazione dei suoi geni con l'ambiente.

Flusso continuo: si riferisce a una prova in cui le soluzioni di prova sono rinnovate costantemente.

Fronda: struttura individuale/singola del tipo "a foglia" di una pianta di lenticchia d'acqua. Si tratta dell'unità più piccola (individuo) in grado di riprodursi.

Gibbosità: gobba o rigonfiamento della fronda.

Mezzo di prova: mezzo di crescita sintetico completo in cui le piante sperimentali crescono quando sono esposte alla sostanza chimica in esame. Quest'ultima è di norma disciolta nel mezzo di prova.

Monocoltura: coltura con una sola specie vegetale.

Necrosi: tessuto morto delle fronde (ossia bianco o rigonfio d'acqua).

Prova semistatica (con rinnovo): prova in cui la soluzione di prova è periodicamente sostituita a determinati intervalli durante la prova.

Prova statica: prova senza rinnovo della soluzione di prova durante la prova.

Rendimento: valore di una variabile di misurazione che esprime la differenza tra la biomassa al termine del periodo di esposizione e il valore della stessa variabile all'inizio del periodo di esposizione.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela saggiata seguendo il presente metodo di prova.

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

Tasso di crescita (tasso di crescita specifico medio): aumento logaritmico della biomassa durante il periodo di esposizione.

Variabili di misurazione: qualsiasi tipo di variabile che viene misurata per esprimere l'endpoint della prova utilizzando una o più variabili di risposta. Nel presente metodo il numero di fronde, l'area delle fronde, il peso fresco e il peso secco sono variabili di misurazione.

Variabili di risposta: variabili per la stima della tossicità, ricavate da qualsiasi variabile di misurazione che descrive la biomassa mediante vari metodi di calcolo. Nel presente metodo di prova i tassi di crescita e il rendimento sono variabili di risposta ricavate da variabili di misurazione quali il numero di fronde, l'area delle fronde, il peso fresco e il peso secco.

Appendice 2

Descrizione di *Lemna* spp.

La pianta acquatica comunemente denominata “lenticchia d’acqua”, *Lemna* spp., appartiene alla famiglia delle Lemnaceae costituita da quattro generi presenti in tutto il mondo. La loro tassonomia e il loro aspetto sono stati descritti in maniera esaustiva (1)(2). *Lemna gibba* e *L. minor* sono specie rappresentative delle zone temperate e sono regolarmente utilizzate nelle prove di tossicità. Entrambe le specie possiedono un fusto discoide (fronda) galleggiante o sommerso e una radice estremamente sottile che parte dal centro della superficie inferiore di ogni fronda. Le specie di *Lemna* fioriscono raramente e si riproducono per via vegetativa dando luogo a nuove fronde (3). Rispetto alle piante più vecchie, le giovani tendono ad essere più pallide, avere radici più corte ed essere costituite da 2-3 fronde di misure diverse. Le dimensioni ridotte di *Lemna*, la sua struttura semplice, la riproduzione asessuata e il tempo di generazione breve rendono le piante di questo genere particolarmente adatte alle prove di laboratorio (4) (5).

Data la possibile variazione di sensibilità da una specie all'altra, sono validi solo i confronti di sensibilità all'interno della stessa specie.

Esempi di specie di *Lemna* utilizzati per le prove con riferimenti bibliografici

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. *J. phys. Chem.*, 29: 935-941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., “Public draft”. EPA 712-C-96-156. 8pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 pp. (in svedese).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., “Public draft”. EPA 712-C-96-156. 8pp.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 5:87-96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 12:481-483.

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. *Verh.-Int. Ver. Limnol.*, 19:2102-2111.

Fonti di specie di *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

North Carolina State University

Forestry Dept

Duckweed Culture Collection

Campus Box 8002

Raleigh, NC 27695-8002

Stati Uniti

Tel.: 001 (919) 515-7572

e-mail: astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University

SE-106 91

Stoccolma

Svezia

Tel.: +46 8 674 7240

Fax +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)

FG III 3.4

Schichauweg 58

12307 Berlino

Germania

e-mail: lemma@uba.de

BIBLIOGRAFIA

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.

Appendice 3

Conservazione di una coltura madre

Le colture madre possono essere conservate a basse temperature (4-10 °C) per lunghi periodi senza che occorra ristabilirle. Il mezzo di crescita di *Lemna* può essere identico a quello utilizzato per le prove, ma è possibile utilizzare anche altri mezzi ricchi di nutrienti per le colture madre.

Periodicamente si prelevano e si trasferiscono, con una tecnica asettica, piante giovani di colore verde-chiaro in nuovi recipienti di coltura contenenti mezzo fresco. Alle temperature più basse qui proposte, le sottoculture possono essere avviate anche a intervalli di tre mesi.

Occorre utilizzare recipienti di coltura in vetro sterili e chimicamente puliti (lavati con acido) e manipolare il materiale secondo tecniche asettiche. Se la coltura madre viene contaminata, per esempio da alghe o funghi, si adotteranno le misure necessarie per eliminare gli organismi contaminanti. Per le alghe e la maggior parte degli altri organismi contaminanti basta una sterilizzazione superficiale. A tal fine si preleva un campione del materiale vegetale contaminato, si taglano le radici, si agita vigorosamente in acqua pulita e lo si immerge in una soluzione di ipoclorito di sodio a 0,5 % (v/v) per un periodo compreso tra 30 secondi e 5 minuti. In seguito si sciacqua il materiale vegetale con acqua sterile e lo si trasferisce, suddiviso per lotti, in recipienti di coltura contenenti mezzo fresco. Molte fronde moriranno dopo questo trattamento, soprattutto se il periodo di esposizione è stato lungo, ma alcune di quelle sopravvissute non saranno più contaminate e potranno essere inoculate in nuove colture.

Appendice 4

Mezzi

Si raccomandano mezzi di crescita diversi per *L. minor* e *L. gibba*: per *L. minor*, una versione modificata del mezzo stabilito dalla norma svedese (SIS) mentre per *L. gibba*, il mezzo 20X — AAP. La composizione di questi due mezzi sono riportate qui di seguito. Per preparare i mezzi occorre utilizzare sostanze chimiche di grado analitico o reagente e acqua deionizzata.

Mezzo di crescita per *Lemma* stabilito dalla norma svedese (SIS)

- Le soluzioni madre I-V sono sterilizzate in autoclave (120 °C, 15 minuti) o mediante filtrazione su membrana (dimensione dei pori di circa 0,2 µm).
- La soluzione madre VI (e opzionalmente VII) è sterilizzata solo mediante filtrazione su membrana; non deve essere sottoposta a sterilizzazione in autoclave.
- Le soluzioni madre sterili devono essere conservate al fresco e al buio. Le soluzioni madre I-V devono essere eliminate dopo sei mesi, mentre la soluzione madre VI (e opzionalmente VII) si conserva per un solo mese.

Solu-zione madre	Sostanza	Concentrazione nella soluzione madre (g/l)	Concentrazione nel mezzo preparato (mg/l)	Mezzo preparato	
				Elemento	Concentrazione (mg/l)
I	NaNO ₃	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH ₂ PO ₄	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	MgSO ₄ · 7H ₂ O	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	CaCl ₂ · 2H ₂ O	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na ₂ CO ₃	4,0	20	C	2,3
V	H ₃ BO ₃	1,0	1,00	B	0,17
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,20	0,20	Mn	0,056
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,010	0,010	Mo	0,0040
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,050	0,050	Zn	0,011
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na ₂ - EDTA 2H ₂ O	0,28	1,4	-	-
VII	MOPS (tampone)	490	490	-	-

Per ottenere un litro del mezzo SIS aggiungere gli ingredienti seguenti a 900 ml di acqua deionizzata:

- 10 ml di soluzione madre I
- 5 ml di soluzione madre II
- 5 ml di soluzione madre III
- 5 ml di soluzione madre IV
- 1 ml di soluzione madre V
- 5 ml di soluzione madre VI
- 1 ml di soluzione madre VII (facoltativo)

Nota: per alcune sostanze chimiche in esame può essere necessario utilizzare anche la soluzione madre VII (tampone MOPS) (cfr. paragrafo 11).

Il pH è portato a $6,5 \pm 0,2$ con 0,1 o 1 mol di HCl o NaOH, e il volume è portato ad un litro con acqua deionizzata.

Mezzo di crescita 20X — AAP

Le soluzioni madre sono preparate in acqua sterile distillata o deionizzata.

Le soluzioni madre sterili devono essere conservate al fresco e al buio. In queste condizioni si possono conservare da 6 a 8 settimane.

Per il mezzo 20X — AAP si preparano cinque soluzioni madre nutrienti (A1, A2, A3, B e C) utilizzando sostanze chimiche di grado reagente. Il mezzo di crescita è composto da 20 ml di ciascuna soluzione madre nutriente aggiunte a circa 850 ml di acqua deionizzata. Il pH è portato a $7,5 \pm 0,1$ con 0,1 o 1 mol di HCl o NaOH, e il volume è portato ad un litro con acqua deionizzata. Il mezzo è successivamente filtrato con una membrana con pori di 0,2 µm (circa) in un recipiente sterile.

Il mezzo di crescita destinato alle prove deve essere preparato 1 o 2 giorni prima dell'utilizzazione in modo che il pH abbia il tempo di stabilizzarsi. Il pH del mezzo di crescita deve essere controllato prima dell'utilizzo e riequilibrato, se necessario, aggiungendovi 0,1 o 1 mol di NaOH o HCl come su indicato.

Solu-zione madre	Sostanza	Concentrazione nella soluzione madre (g/l) (*)	Concentrazione nel mezzo preparato (mg/l) (*)	Mezzo preparato	
				Elemento	Concentrazione (mg/l) (*)
A1	NaNO ₃	26	510	Na;N	190,84
	MgCl ₂ .6H ₂ O	12	240	Mg	58,08
	CaCl ₂ .2H ₂ O	4,4	90	Ca	24,04
A2	MgSO ₄ · 7H ₂ O	15	290	S	38,22
A3	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	1,4	30	K;P	9,4;3,7

Solu-zione madre	Sostanza	Concentrazione nella soluzione madre (g/l) (*)	Concentrazione nel mezzo preparato (mg/l) (*)	Mezzo preparato	
				Elemento	Concentrazione (mg/l) (*)
B	H ₃ BO ₃	0,19	3,7	B	0,65
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,42	8,3	Mn	2,3
	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,16	3,2	Fe	0,66
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,30	6,0	—	—
	ZnCl ₂	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	CoCl ₂ .6H ₂ O	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	NaHCO ₃	15	300	Na;C	220; 43

(*) Salvo indicazione contraria.

Nota: la concentrazione finale di bicarbonato teoricamente ideale (che consente di evitare un adeguamento apprezzabile del pH) è 15 mg/l, e non 300 mg/l. Tuttavia il mezzo 20X — AAP è stato sempre utilizzato con una concentrazione di 300 mg/l, anche per il ring-test. [I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999). The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency].

Mezzo di STEINBERG (secondo la norma ISO 20079)

Concentrazioni e soluzioni madre

La norma ISO 20079 utilizza il mezzo modificato di Steinberg solo per *Lemna minor* (in quanto è la sola specie ammessa per tale metodo), ma alcune prove hanno dimostrato che si possono ottenere buoni risultati anche con *Lemna gibba*.

Per preparare questo mezzo occorre utilizzare sostanze chimiche di grado reagente o analitico e acqua deionizzata.

Preparare il mezzo nutriente a partire da soluzioni madre oppure dal mezzo dieci volte più concentrato, che è la concentrazione massima che si può ottenere senza precipitazione.

Tabella 1

Mezzo di Steinberg a pH stabilizzato (modificato da Altenburger)

Componente		Mezzo nutriente	
Macroelementi	Peso molare	mg/l	mmol/l
KNO ₃	101,12	350,00	3,46
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	236,15	295,00	1,25
KH ₂ PO ₄	136,09	90,00	0,66
K ₂ HPO ₄	174,18	12,60	0,072
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,37	100,00	0,41

Componente		Mezzo nutriente	
Microelementi	Peso molare	µg/l	µmol/l
H ₃ BO ₃	61,83	120,00	1,94
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287,43	180,00	0,63
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	241,92	44,00	0,18
MnCl ₂ · 4H ₂ O	197,84	180,00	0,91
FeCl ₃ · 6H ₂ O	270,21	760,00	2,81
EDTA diidrato di sodio	372,24	1 500,00	4,03

Tabella 2

Soluzioni madre (macroelementi)

1. Macroelementi (50 volte più concentrati)	g/l
Soluzione madre 1:	
KNO ₃	17,50
KH ₂ PO ₄	4,5
K ₂ HPO ₄	0,63
Soluzione madre 2:	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5,00
Soluzione madre 3:	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	14,75

Tabella 3

Soluzioni madre (microelementi)

2. Microelementi (1 000 volte più concentrati)	mg/l
Soluzione madre 4:	
H ₃ BO ₃	120,0
Soluzione madre 5:	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	180,0
Soluzione madre 6:	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	44,0

2. Microelementi (1 000 volte più concentrati)	mg/l
Soluzione madre 7:	
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180,0
Soluzione madre 8:	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	760,00
EDTA diidrato di sodio	1 500,00

- Le soluzioni madre 2 e 3 possono essere mischiate, così come le soluzioni 4 e 7 (tenendo conto delle concentrazioni necessarie).
- Per aumentarne la durata di conservazione, occorre sterilizzare le soluzioni madre in autoclave per 20 minuti a 121 °C oppure filtrarle in modo sterile su una membrana porosa (0,2 µm). Per la soluzione madre 8 si consiglia vivamente la sterilizzazione mediante filtrazione (0,2 µm).

Preparazione della concentrazione finale del mezzo di STEINBERG (modificato):

- aggiungere 20 ml delle soluzioni madre 1, 2 e 3 (cfr. tabella 2) a circa 900 ml di acqua deionizzata per impedire la precipitazione;
- aggiungere 1,0 ml delle soluzioni madre 4, 5, 6, 7 e 8 (cfr. tabella 3);
- il pH deve essere pari a 5,5 ± 0,2 (aggiustare aggiungendo un volume minimo di soluzione di NaOH o di HCl);
- portare a 1 000 ml con acqua;
- se le soluzioni madre sono sterilizzate e si utilizza un'acqua adeguata non è necessaria un'ulteriore sterilizzazione. Se il mezzo finale viene sterilizzato, la soluzione madre 8 va aggiunta dopo il trattamento in autoclave (a 121 °C per 20 minuti).

Preparazione del mezzo di STEINBERG (modificato) concentrato dieci volte per conservazione temporanea:

- aggiungere 20 ml delle soluzioni madre 1, 2 e 3 (cfr. tabella 2) a circa 30 ml di acqua per impedire la precipitazione;
- aggiungere 1,0 ml delle soluzioni madre 4, 5, 6, 7 e 8 (cfr. tabella 3). Portare a 100 ml con acqua;
- se le soluzioni madre sono sterilizzate e si utilizza un'acqua adeguata non è necessaria un'ulteriore sterilizzazione. Se il mezzo finale viene sterilizzato, la soluzione madre 8 va aggiunta dopo il trattamento in autoclave (a 121 °C per 20 minuti);
- il pH del mezzo (concentrazione finale) deve essere pari a 5,5 ± 0,2.»

(6) Sono aggiunti i seguenti capitoli da C.31 a C.46:

«C.31. PROVA SULLE PIANTE TERRESTRI: EMERGENZA DELLE PLANTULE E CRESCITA DELLE PLANTULE

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova equivale alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 208 (2006). I metodi di prova sono periodicamente rivisti alla luce dei progressi scientifici e dell'applicabilità a fini regolamentari. Il presente metodo di prova aggiornato è inteso a valutare i potenziali effetti delle sostanze chimiche sull'emergenza e la crescita delle plantule. Esso non copre gli effetti cronici o gli effetti sulla riproduzione (ossia granitura, formazione dei fiori, maturazione dei frutti). È necessario tenere conto delle condizioni di esposizione e delle proprietà delle sostanze chimiche da esaminare per garantire l'utilizzo di metodi di prova appropriati (ad esempio, nelle prove su metalli o composti di metalli è necessario considerare gli effetti del pH e dei controioni associati) (1). Il presente metodo di prova non riguarda le piante esposte ai vapori delle sostanze chimiche. Esso si applica alle prove su sostanze chimiche generali, biocidi e fitofarmaci (denominati anche prodotti fitosanitari o pesticidi). È stato elaborato sulla base di metodi esistenti (2) (3) (4) (5) (6) (7). Sono stati presi in considerazione anche altri riferimenti bibliografici correlati alle prove sulle piante (8) (9) (10). L'appendice 1 contiene le definizioni di termini utili ai fini del presente metodo.

PRINCIPIO DELLA PROVA

2. La prova valuta gli effetti dell'esposizione alla sostanza chimica in esame contenuta nel terreno (o in un'altra matrice del suolo appropriata) sull'emergenza delle plantule e sulle fasi iniziali di crescita delle piante superiori. I semi sono messi a contatto con il terreno trattato con la sostanza chimica in esame, i cui effetti sono valutati generalmente 14-21 giorni dopo l'emergenza del 50 % delle plantule nel gruppo di controllo. Gli endpoint misurati sono la valutazione visiva dell'emergenza delle plantule, il peso dei germogli secchi (in alternativa, il peso dei germogli freschi) e in alcuni casi l'altezza dei germogli, nonché la valutazione degli effetti nocivi visibili su diverse parti della pianta. Tali misurazioni e osservazioni sono confrontate con quelle effettuate su piante di controllo non trattate.
3. A seconda della via di esposizione prevista, la sostanza chimica in esame è incorporata nel terreno (o eventualmente in una matrice del suolo artificiale) o applicata sulla superficie dello stesso, condizione rappresentativa della potenziale via di esposizione alla sostanza chimica. L'incorporazione avviene mediante il trattamento del terreno in massa. In seguito all'applicazione, il terreno è trasferito in vasi e quindi i semi della specie vegetale prescelta vengono piantati nel terreno. Nel caso dell'applicazione superficiale, la sostanza è applicata al terreno in vaso in cui siano già stati piantati i semi. Le unità di prova (i controlli e il terreno trattato più i semi) sono quindi collocate in un luogo in cui possano godere di condizioni appropriate in grado di favorire la germinazione e/o la crescita delle piante.
4. Secondo l'obiettivo dello studio, la prova può essere eseguita al fine di determinare la curva dose-risposta oppure per saggiare una singola concentrazione/un singolo tasso, nel qual caso costituisce una prova limite. Se i risultati della prova a una singola concentrazione/un singolo tasso superano un determinato livello di tossicità (ad esempio, se si osservano effetti superiori all' $x\%$), si procede all'esecuzione di una prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni per determinare il limite superiore e quello inferiore per la tossicità, seguita da una prova a più concentrazioni/tassi per generare una curva dose-risposta. Si ricorre a un'analisi statistica appropriata per ottenere una concentrazione efficace EC_x o un tasso di applicazione efficace ER_x (ad esempio, EC₂₅, ER₂₅, EC₅₀, ER₅₀) per il parametro o i parametri pertinenti più sensibili. Questa prova consente di ottenere anche i valori per la concentrazione senza effetti osservabili (NOEC, No Observed Effect Concentration) e la concentrazione minima a cui si osserva un effetto statisticamente significativo (LOEC, Lowest Observed Effect Concentration).

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA CHIMICA IN ESAME

5. Le seguenti informazioni sono utili per identificare la via di esposizione prevista alla sostanza chimica e progettare la prova: formula strutturale, purezza, idrosolubilità, solubilità nei solventi organici, coefficiente di ripartizione 1-ottanolo/acqua, comportamento di assorbimento del suolo, tensione di vapore, stabilità chimica in acqua e alla luce e biodegradabilità.

VALIDITÀ DELLA PROVA

6. Affinché la prova possa essere ritenuta valida, i controlli devono soddisfare i seguenti criteri:
 - l'emergenza delle plantule è pari ad almeno il 70 %;
 - sulle plantule non sono visibili effetti fitotossici (ad esempio clorosi, necrosi, appassimento, deformazioni di foglie e stelo) e si osservano solo variazioni normali della crescita e della morfologia per la specie esaminata;
 - il tasso medio di sopravvivenza delle plantule di controllo emerse è di almeno il 90 % per la durata dello studio;
 - le condizioni ambientali per una particolare specie sono identiche e i mezzi culturali contengono la stessa quantità di matrice del suolo, mezzo di supporto o substrato proveniente dalla stessa fonte.

SOSTANZA CHIMICA DI RIFERIMENTO

7. È possibile sottoporre a prova una sostanza chimica di riferimento a intervalli regolari per verificare che l'esecuzione della prova, la risposta delle piante scelte per la prova e le condizioni sperimentali non cambino in modo significativo nel tempo. In alternativa, è possibile utilizzare misurazioni storiche della biomassa o della crescita dei controlli per esaminare le prestazioni del sistema di prova in laboratori particolari; tali misurazioni possono essere utilizzate anche per il controllo della qualità intralaboratorio.

DESCRIZIONE DEL METODO**Terreno naturale — substrato artificiale**

8. Le piante possono essere coltivate in vasi contenenti terreno sabbioso limoso, sabbia limacciosa o limo argilloso e sabbioso con tenore in carbonio organico dell'1,5 % (circa il 3 % di materia organica). Si può utilizzare anche del terriccio da rinvaso commerciale o una miscela di terreno sintetico contenente fino all'1,5 % di carbonio organico. Non bisogna utilizzare terreni argillosi se la sostanza chimica in esame ha notoriamente un'affinità elevata per le argille. Il terreno di campo deve essere setacciato per omogeneizzare la dimensione delle particelle in modo che non superino i 2 mm, rimuovendo le particelle più grosse. Si devono indicare il tipo e la struttura, la percentuale di carbonio organico, il pH e il tenore di sale calcolato in base alla conduttività elettronica del terreno preparato finale. Il terreno deve essere classificato in base a un sistema di classificazione standard (11). Al fine di ridurre gli effetti dei patogeni del terreno, quest'ultimo può essere pastorizzato o sottoposto a trattamento termico.
9. L'impiego di terreno naturale può rendere più complessa l'interpretazione dei risultati e aumentare la variabilità a causa delle differenze nelle caratteristiche chimico-fisiche e nelle popolazioni microbiche. Queste variabili a loro volta modificano la capacità di ritenzione dell'umidità, la capacità di legame chimico, l'aerazione e il tenore in nutrienti e oligoelementi. Alle variazioni che riguardano questi fattori fisici si aggiungono variazioni relative alle caratteristiche chimiche, come il pH e il potenziale di ossido-riduzione, che possono influire sulla biodisponibilità della sostanza chimica in esame (12) (13) (14).
10. Di solito i substrati artificiali non sono utilizzati per sottoporre a prova i fitofarmaci, ma possono essere utili per sottoporre a prova le sostanze chimiche generali o se si desidera ridurre al minimo la variabilità dei terreni naturali e aumentare la comparabilità dei risultati delle prove. I substrati utilizzati devono essere costituiti da materiali inerti che presentino interazioni minime con la sostanza chimica in esame, il vettore solvente o entrambi. La sabbia di quarzo lavata in acido, la lana minerale e le perle di vetro (per esempio con un diametro compreso tra 0,35 e 0,85 mm) si sono rivelate materiali inerti idonei, che assorbono la sostanza chimica in esame in misura minima (15), garantendo così la sua massima disponibilità per le plantule mediante assorbimento dalle radici. Tra i substrati non idonei figurano la vermiculite, la perlite o altri materiali altamente assorbenti. È necessario assicurare l'apporto di nutrienti che favoriscano la crescita delle piante per evitare che queste soffrano di carenze nutritive, le quali, ove possibile, devono essere accertate mediante un'analisi chimica o una valutazione visiva delle piante di controllo.

Criteri di selezione delle specie sperimentali

11. La gamma delle specie selezionate deve essere ragionevolmente ampia, ad esempio in termini di diversità tassonomica nel regno vegetale, distribuzione, abbondanza, caratteristiche del ciclo di vita specifiche della specie e regioni di presenza naturale, per permettere lo sviluppo di una serie di risposte (8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). Nella selezione delle specie sperimentali bisogna tenere conto delle seguenti caratteristiche:
 - i semi della specie sono uniformi e facilmente reperibili presso una o più fonti standard affidabili e producono una germinazione regolare, affidabile e uniforme, nonché una crescita uniforme delle plantule;
 - la pianta può essere sottoposta a prova in laboratorio e può dare risultati affidabili e riproducibili nello stesso laboratorio e tra laboratori diversi;
 - la sensibilità della specie sottoposta a prova deve essere coerente con le risposte delle piante che si trovano nell'ambiente esposto alla sostanza chimica;
 - la specie è stata già utilizzata in qualche misura in precedenti prove di tossicità e il suo utilizzo, ad esempio nei saggi biologici sugli erbicidi, nello screening per la rilevazione di metalli pesanti, nelle prove di stress salino o minerale o negli studi sull'allelopatia, indica una sensibilità a una vasta gamma di fattori di stress;
 - la specie è compatibile con le condizioni culturali del metodo di prova;
 - la specie soddisfa i criteri di validità della prova.

Nell'appendice 2 sono elencate alcune delle specie storicamente più utilizzate nelle prove, mentre nell'appendice 3 sono elencate potenziali specie non coltivate.

12. Il numero di specie da sottoporre a prova dipende dalle pertinenti disposizioni regolamentari e pertanto non è specificato nel presente metodo di prova.

Applicazione della sostanza chimica in esame

13. La sostanza chimica deve essere applicata utilizzando un vettore appropriato (ad esempio, acqua, acetone, etanolo, polietilenglicole, gomma arabica, sabbia). È possibile sottoporre a prova anche le miscele (prodotti formulati o formulazioni) contenenti principi attivi e diversi adiuvanti.

Incorporazione nel terreno o nel substrato artificiale

14. È possibile aggiungere all'acqua le sostanze chimiche idrosolubili o in sospensione in acqua e quindi mescolare la soluzione con del terreno con l'ausilio di un adeguato miscelatore. Questo tipo di prova può essere appropriato se l'esposizione alla sostanza chimica avviene attraverso il terreno o l'acqua interstiziale o se sussiste il rischio di assorbimento dalle radici. La quantità di sostanza in esame aggiunta non deve superare la capacità di ritenzione idrica del terreno. Il volume di acqua aggiunto deve essere identico per ogni concentrazione di prova, ma è opportuno limitarlo per impedire la formazione di agglomerati di terreno.
15. Le sostanze chimiche che presentano una bassa idrosolubilità devono essere disciolte in un solvente volatile adeguato (ad esempio acetone, etanolo) e mescolate alla sabbia. Il solvente può quindi essere rimosso dalla sabbia utilizzando un flusso d'aria mentre si mescola continuamente la sabbia. La sabbia trattata è mescolata al terreno sperimentale. Viene preparato un secondo controllo costituito unicamente da sabbia e solvente. Ai trattamenti a tutti i livelli e al secondo controllo vengono aggiunti quantitativi identici di sabbia in cui il solvente sia stato mescolato e quindi rimosso. Nel caso in cui le sostanze chimiche in esame siano solide e insolubili, occorre mescolare il terreno asciutto e la sostanza in un miscelatore idoneo. Dopo avere aggiunto il terreno ai vasi si procede immediatamente con la semina.
16. Quando si utilizza un substrato artificiale al posto del terreno, le sostanze chimiche idrosolubili possono essere disciolte nella soluzione nutritiva appena prima dell'inizio della prova. Le sostanze chimiche che non sono idrosolubili, ma che possono essere messe in sospensione nell'acqua mediante un vettore solvente, devono essere aggiunte con quest'ultimo alla soluzione nutritiva. Le sostanze chimiche non idrosolubili per le quali non è disponibile un vettore solubile in acqua non tossico devono essere disciolte in un solvente volatile appropriato. La soluzione, mescolata alla sabbia o alle perle di vetro, è collocata in un'apparecchiatura rotante sotto vuoto, dove viene fatta evaporare, lasciando uno strato uniforme di sostanza chimica sulla sabbia o sulle perle. È necessario estrarre una quantità pesata di perle con lo stesso solvente organico e dosare la sostanza chimica prima di riempire i vasi.

Applicazione superficiale

17. Nel caso dei fitofarmaci, la sostanza chimica in esame spesso viene applicata mediante dispersione della soluzione di prova nebulizzata sulla superficie del terreno. Il modello e la capacità di tutte le apparecchiature utilizzate per eseguire le prove, comprese le apparecchiature con cui viene preparata e applicata la sostanza chimica in esame, devono essere tali da consentire un'esecuzione precisa delle prove, con una copertura riproducibile. La copertura deve essere uniforme sulle superfici del terreno. Bisogna prestare attenzione per evitare l'eventuale interazione, mediante assorbimento o reazione, delle sostanze chimiche con l'apparecchiatura (ad esempio, tubi di plastica e sostanze chimiche lipofile o elementi e parti in acciaio). La polverizzazione della sostanza chimica in esame sulla superficie del terreno è effettuata simulando le tipiche applicazioni con nebulizzatore. In generale, i volumi polverizzati devono corrispondere a quelli utilizzati nella normale pratica agricola e devono essere indicati (quantità d'acqua, ecc.). È necessario selezionare un tipo di ugello che consenta una copertura uniforme della superficie del terreno. Se si applicano solventi e vettori, bisogna stabilire un secondo gruppo di piante di controllo che riceva unicamente il solvente o il vettore. Tale procedura non è necessaria per i fitofarmaci che vengono testati come formulazioni.

Verifica della concentrazione o del tasso della sostanza chimica in esame

18. Le concentrazioni o i tassi di applicazione devono essere confermati da un'adeguata verifica analitica. Per le sostanze chimiche solubili, la verifica di tutte le concentrazioni o di tutti i tassi può essere confermata mediante l'analisi della concentrazione più elevata della soluzione di prova, associata alla documentazione sulle diluizioni successive e all'utilizzo di apparecchiature per l'applicazione tarate (ad esempio, vetreria per analisi tarata, taratura del nebulizzatore). Nel caso delle sostanze chimiche insolubili, la verifica dei materiali compositi deve basarsi sul peso della sostanza chimica in esame aggiunta al terreno. Se è richiesta la dimostrazione dell'omogeneità, può rendersi necessaria l'analisi del terreno.

PROCEDURA

Disegno sperimentale

19. Semi della stessa specie sono piantati nei vasi. Il numero di semi piantati per ogni vaso dipende dalla specie, dalle dimensioni del vaso e dalla durata della prova. Il numero di piante per vaso deve essere tale da garantire condizioni colturali adeguate ed evitare l'affollamento per l'intera durata della prova. La densità massima deve essere di circa 3-10 semi per 100 cm², a seconda della dimensione dei semi. Si consiglia ad esempio, per un recipiente di 15 cm, una densità di 1-2 piante di mais, soia, pomodoro, cetriolo o barbabietola da zucchero, di tre piante di colza o piselli e di 5-10 piante di cipolla, grano o altri semi di piccole dimensioni. Il numero di semi e di vasi di replica (una replica corrisponde a un vaso e pertanto le piante nello stesso vaso non costituiscono una replica) deve essere adeguato alle condizioni richieste da un'analisi statistica ottimale (21). Va osservato che la variabilità è maggiore per le specie sperimentali per le quali si utilizza un numero inferiore di semi grandi per ciascun vaso (replica) rispetto alle specie sperimentali per le quali è possibile utilizzare un numero più alto di semi piccoli per ciascun vaso. Piantando il medesimo numero di semi in ogni vaso si può ridurre al minimo la variabilità.
20. I gruppi di controllo sono utilizzati per garantire che gli effetti osservati siano associati o attribuiti unicamente all'esposizione alla sostanza chimica in esame. Il gruppo di controllo appropriato deve essere identico sotto tutti gli aspetti al gruppo sottoposto a prova, eccetto per l'esposizione alla sostanza chimica in esame. Nell'ambito di una data prova, tutte le piante sottoposte a prova, compresi i controlli, devono provenire dalla stessa fonte. Per prevenire le distorsioni, è indispensabile un'assegnazione casuale dei vasi di prova e di controllo.
21. Va evitato l'uso di semi conciati con insetticidi o fungicidi (semi trattati). Tuttavia, l'uso di taluni fungicidi da contatto non sistemici (ad esempio il captano o il tiram) è consentito da alcune autorità di regolamentazione (22). L'eventuale problema dei patogeni portati da seme può essere risolto immergendo brevemente i semi in una soluzione debole di ipoclorito al 5 % e quindi sciacquandoli accuratamente con acqua corrente e asciugandoli. Non sono consentiti altri trattamenti curativi a base di fitofarmaci.

Condizioni sperimentali

22. Le condizioni sperimentali devono essere molto simili alle condizioni necessarie alla crescita normale delle specie e delle varietà testate (cfr. appendice 4 per esempi delle condizioni sperimentali). Le piante emergenti devono essere curate facendo ricorso a buone pratiche culturali in locali ad ambiente controllato, fitotroni o serre. Quando si utilizzano strutture per la coltivazione, queste pratiche generalmente comprendono il controllo e una registrazione sufficientemente frequente (ad esempio giornaliera) della temperatura, dell'umidità, della concentrazione di biossido di carbonio, della luce (intensità, lunghezza d'onda, irraggiamento fotosinteticamente attivo) e del fotoperiodo, dei mezzi di irrigazione, ecc. al fine di assicurare una crescita soddisfacente della pianta quale stabilità sulla base dell'osservazione delle piante di controllo della specie selezionata. La temperatura delle serre va regolata attraverso sistemi di ventilazione, riscaldamento e/o raffreddamento. Le seguenti condizioni sono generalmente raccomandate per le prove in serra:

- temperatura: 22 °C ± 10 °C;
- umidità: 70 % ± 25 %;
- fotoperiodo: minimo 16 ore di luce;
- intensità luminosa: 350 ± 50 µE/m²/s. Potrebbe essere necessaria un'illuminazione aggiuntiva se l'intensità diminuisce al di sotto di 200 µE/m²/s, lunghezza d'onda 400-700 nm, ad eccezione di alcune specie con un fabbisogno di luce inferiore.

Le condizioni ambientali devono essere monitorate e riferite durante lo studio. Le piante devono essere coltivate in vasi vetrinati o di plastica non porosi poggiati su sottovasi. È possibile riposizionare periodicamente i vasi per ridurre al minimo la variabilità in termini di crescita delle piante (dovuta al variare delle condizioni sperimentali all'interno delle strutture per la coltivazione). I vasi devono essere sufficientemente grandi da consentire una crescita normale.

23. È possibile integrare nutrienti del terreno in base alle necessità per mantenere il vigore delle piante. È possibile stabilire la necessità di ulteriori nutrienti e il calendario per la loro aggiunta osservando le piante di controllo. Si consiglia di irrigare le piante dal fondo dei contenitori (ad esempio utilizzando stoppini in fibra di vetro). Tuttavia un'irrigazione iniziale effettuata dall'alto può stimolare la germinazione dei semi e, in caso di applicazione sulla superficie del terreno, facilitare la penetrazione della sostanza chimica nello stesso.

24. Le condizioni di coltura specifiche devono essere appropriate per la specie sottoposta a prova e la sostanza chimica in esame. È necessario mantenere le stesse condizioni ambientali per le piante utilizzate come controlli e quelle trattate, prendendo tuttavia misure adeguate per evitare l'esposizione incrociata (ad esempio a sostanze chimiche volatili) tra trattamenti differenti e l'esposizione dei controlli alla sostanza chimica in esame.

Esecuzione della prova a una singola concentrazione o a un singolo tasso

25. Ai fini della determinazione della concentrazione o del tasso appropriato di una sostanza chimica per l'esecuzione di una prova a una singola concentrazione o a un singolo tasso (stimolazione/limite) vanno presi in considerazione diversi fattori. Per le sostanze chimiche generali, tra questi fattori figurano le proprietà chimico-fisiche. Per i fitofarmaci bisogna tenere conto delle proprietà chimico-fisiche e del modello d'uso della sostanza chimica in esame, della sua concentrazione massima o del suo tasso di applicazione massimo, del numero di applicazioni per ogni stagione e/o della persistenza della sostanza. Per stabilire se una sostanza chimica generale possiede proprietà fitotossiche, può essere opportuno eseguire la prova a un livello massimo di 1 000 mg/kg di terreno asciutto.

Prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni

26. Se necessario, è possibile eseguire una prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni per ottenere indicazioni sulle concentrazioni o sui tassi da testare nello studio dose-risposta definitivo. In una prova di questo tipo le concentrazioni o i tassi da testare devono essere ampiamente distanziati (ad esempio: 0,1 - 1,0 - 10 - 100 e 1 000 mg/kg di terreno asciutto). Per i fitofarmaci, si possono calcolare le concentrazioni o i tassi a partire dalla concentrazione o dal tasso di applicazione massimo o raccomandato, ad esempio 1/100, 1/10, 1/1 rispetto alla concentrazione o al tasso di applicazione massimo o raccomandato.

Esecuzione della prova a più concentrazioni o tassi

27. Lo scopo di una prova a più concentrazioni o tassi è stabilire una relazione dose-risposta e determinare un valore EC_x o ER_x per l'emergenza, la biomassa e/o gli effetti visibili rispetto ai controlli non esposti, come richiesto dalle autorità di regolamentazione.
28. Il numero di concentrazioni o di tassi e gli intervalli tra di essi devono essere sufficienti a produrre una relazione dose-risposta e un'equazione di regressione affidabili e a ottenere una stima dei valori EC_x o ER_x . Le concentrazioni o i tassi selezionati devono includere i valori EC_{50} o ER_{50} da determinare. Ad esempio, per ottenere un valore EC_{50} è preferibile eseguire la prova a tassi in grado di produrre un effetto compreso tra il 20 e l'80 %. Il numero raccomandato di concentrazioni o tassi di prova per conseguire questo risultato è pari almeno a 5 in una serie geometrica, più un controllo non trattato, con un fattore di spaziatura non superiore a 3. Per ogni gruppo di trattamento e di controllo, il numero di repliche deve essere pari almeno a 4 e il numero totale di semi almeno a 20. Al fine di aumentare la significatività statistica della prova, per alcune piante che presentano un tasso di germinazione basso o una crescita variabile possono essere necessarie più repliche. Se si utilizza un numero elevato di concentrazioni o tassi di prova, il numero di repliche può essere ridotto. Per stimare la NOEC, potrebbero essere necessarie più repliche al fine di ottenere la significatività statistica desiderata (23).

Osservazioni

29. Durante il periodo di osservazione, ossia da 14 a 21 giorni dopo l'emergenza del 50 % delle piante di controllo (e, se del caso, dei controlli con solvente), le piante vengono osservate spesso (almeno una volta la settimana e, se possibile, una volta al giorno) per valutare l'emergenza, la fitotossicità visibile e la mortalità. Alla fine della prova è necessario registrare la misurazione della percentuale di emergenza e della biomassa delle piante sopravvissute, nonché gli effetti nocivi visibili sulle diverse parti della pianta, tra i quali figurano anomalie nell'aspetto delle plantule emerse, crescita ritardata, clorosi, scolorimento, mortalità ed effetti sullo sviluppo. La biomassa finale può essere misurata a partire dal peso medio finale dei germogli secchi delle piante sopravvissute, dopo aver raccolto i germogli sulla superficie del terreno e averli fatti essiccare fino a peso costante a 60 °C. In alternativa, è possibile misurare la biomassa finale a partire dal peso dei germogli freschi. Se richiesto dalle autorità di regolamentazione, l'altezza del germoglio può essere un ulteriore endpoint da misurare. È opportuno utilizzare un sistema di punteggio uniforme per le lesioni visibili per valutare le risposte tossiche osservabili. Esempi per l'esecuzione di valutazioni visive qualitative e quantitative sono forniti nei riferimenti (23) (24).

DATI E RELAZIONE**Analisi statistica**

Prova a una singola concentrazione o a un singolo tasso

30. I dati per ogni specie vegetale vanno analizzati utilizzando un metodo statistico appropriato (21). Si deve indicare il livello dell'effetto alla concentrazione o al tasso di prova oppure il mancato ottenimento di un dato effetto alla concentrazione o al tasso di prova (ad esempio, < x % dell'effetto con la concentrazione o il tasso y).

Prova a più concentrazioni o tassi

31. Viene stabilita una relazione dose-risposta come equazione di regressione. Si può ricorrere a modelli diversi: ad esempio, per ottenere una stima di EC_x o ER_x (ad esempio EC₂₅, ER₂₅, EC₅₀, ER₅₀) e dei rispettivi limiti di confidenza per l'emergenza sotto forma di dati quantali, può essere appropriato utilizzare i metodi logit, probit, Weibull, Spearman-Karber, Spearman-Karber semplificato e così via. Per valutare la crescita delle plantule (peso e altezza) come endpoint continui, i valori EC_x o ER_x e i rispettivi limiti di confidenza possono essere stimati ricorrendo a un'analisi di regressione appropriata (ad esempio, l'analisi di regressione non lineare Bruce-Versteeg (25)). Ove possibile, il valore di R² deve essere pari o superiore a 0,7 per le specie più sensibili e le concentrazioni o i tassi di prova utilizzati devono comprendere gli effetti dal 20 all'80 %. Qualora sia necessario stimare la NOEC, è preferibile ricorrere a prove statistiche potenti, da scegliere in base alla distribuzione dei dati (21) (26).

Relazione sulla prova

32. La relazione sulla prova deve riportare i risultati degli studi e contenere una descrizione dettagliata delle condizioni sperimentali, un'approfondita disamina dei risultati, l'analisi dei dati e le conclusioni tratte dall'analisi. È necessario fornire una tabella di riepilogo e una sintesi dei risultati. La relazione deve includere le seguenti informazioni:

Sostanza chimica in esame:

- dati di identificazione della sostanza chimica, proprietà pertinenti della sostanza chimica in esame (ad esempio, log Pow, idrosolubilità, tensione di vapore e informazioni sul destino e sul comportamento nell'ambiente, se disponibili);
- dettagli sulla preparazione della soluzione di prova e verifica delle concentrazioni di prova, secondo quanto specificato al paragrafo 18.

Specie sperimentale:

- dettagli sull'organismo sottoposto alla prova: specie/varietà, famiglia di piante, nome scientifico e nome comune, fonte e storia del seme con il maggior numero possibile di dettagli (ossia, nome del fornitore, percentuale di germinazione, classe di dimensione del seme, numero di lotto o partita, anno del seme o stagione di coltivazione, data di valutazione della germinazione), sopravvivenza, ecc.;
- numero di specie monocotiledoni e dicotiledoni sottoposte a prova;
- giustificazione della scelta delle specie;
- descrizione della conservazione, del trattamento e del mantenimento dei semi.

Condizioni sperimentali:

- infrastrutture di prova (ad esempio laboratorio fitologico, fitotrone e serra);
- descrizione del sistema di prova (ad esempio dimensioni dei vasi, materiale dei vasi e quantità di terreno);
- caratteristiche del terreno (struttura o tipo di terreno: distribuzione e classificazione delle particelle di terreno, proprietà chimico-fisiche tra cui la percentuale di materia organica, la percentuale di carbonio organico e il pH);
- preparazione del terreno o del substrato (ad esempio terreno, terreno artificiale, sabbia, altro) prima della prova;
- descrizione del mezzo nutritivo, se utilizzato;

- applicazione della sostanza chimica in esame: descrizione del metodo di applicazione, descrizione dell'apparecchiatura, tassi di esposizione e volumi, comprese la verifica chimica, la descrizione del metodo di calibrazione e la descrizione delle condizioni ambientali durante l'applicazione;
- condizioni colturali: intensità luminosa (ad esempio l'irraggiamento fotosinteticamente attivo), fotoperiodo, temperature minime/massime, metodo e programma di irrigazione, fertilizzazione;
- numero di semi per vaso, numero di piante per dose, numero di repliche (vasi) per tasso di esposizione;
- tipo e numero di controlli (controlli negativi e/o positivi, controllo con solvente se utilizzato);
- durata della prova.

Risultati:

- tabella di tutti gli endpoint per ciascuna replica, concentrazione/tasso di prova e specie;
- numero e percentuale di emergenza rispetto ai controlli;
- misurazioni della biomassa (peso secco o peso fresco dei germogli) delle piante come percentuale dei controlli;
- altezza dei germogli delle piante come percentuale dei controlli, se misurata;
- lesioni visibili in percentuale e descrizione qualitativa e quantitativa di tali lesioni (clorosi, necrosi, appassimento, deformazione di foglie e stelo, nonché assenza di qualsiasi effetto) causate dalla sostanza chimica in esame rispetto alle piante di controllo;
- descrizione della scala di valutazione utilizzata per stimare le lesioni visibili, nel caso in cui venga fornita una valutazione visiva;
- per gli studi a tasso singolo, è necessario indicare la percentuale di lesioni;
- i valori EC_x o ER_x (ad esempio EC₅₀, ER₅₀, EC₂₅, ER₂₅) e i rispettivi limiti di confidenza. Se si effettua l'analisi di regressione, fornire l'errore standard per l'equazione di regressione e l'errore standard per la stima dei singoli parametri (ad esempio coefficiente angolare, intercetta);
- valori di NOEC (e LOEC), se calcolati;
- descrizione delle procedure statistiche e delle ipotesi utilizzate;
- rappresentazione grafica di tali dati e della relazione dose-risposta delle specie sottoposte a prova.

Varianti delle procedure descritte nel presente metodo di prova ed eventuali eventi anomali verificatisi durante la prova.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Schrader G., Metge K., and Bahadir M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. *Applied Soil Ecology*, 7, 189-193.
- (2) International Organisation of Standards. (1993). ISO 11269-1. Qualità del suolo — Determinazione dell'effetto di inquinanti sulla flora del suolo — Parte 1: Metodo per la misurazione dell'inibizione della crescita delle radici.
- (3) International Organisation of Standards. (1995). ISO 11269-2. Qualità del suolo — Determinazione dell'effetto di inquinanti sulla flora del suolo — Parte 2: Effetti di suoli contaminati sulla emersione e crescita iniziale di vegetali superiori.
- (4) American Standard for Testing Material (ASTM). (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.
- (5) U.S. EPA. (1982). FIFRA, 40CFR, Part 158.540. Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.
- (6) US EPA. (1996). OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850. Ecological Effects Test Guidelines:
 - 850.4000: Background — Non-target Plant Testing;
 - 850.4025: Target Area Phytotoxicity;

- 850.4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence);
 - 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test;
 - 850.4225: Seedling Emergence, Tier II;
 - 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.
- (7) AFNOR, X31-201. (1982). Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1. (1993) Détermination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.
- (8) Boutin, C., Freemark, K.E. and Keddy, C.J. (1993). Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-target plant testing and evaluation. Technical Report Series No.145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Canada.
- (9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., and Zwerger, P. (1997). Effects of Plant Protection Products on Non-Target Organisms — A contribution to the Discussion of Risk Assessment and Risk Mitigation for Terrestrial Non-Target Organisms (Flora and Fauna). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. No 48.
- (10) Hale, B., Hall, J.C., Solomon, K., and Stephenson, G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario Canada.
- (11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).
- (12) Audus, L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. In: Audus, L.J. ed. The Physiology and biochemistry of Herbicides, London, New York, Academic Press, NY, Chapter 5, pp. 163-206.
- (13) Beall, M.L., Jr. and Nash, R.G. (1969). Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61:571-575.
- (14) Beetsman, G.D., Kenney, D.R. and Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247-250.
- (15) U.S. Food and Drug Administration (FDA). (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 pp., FDA, Washington, DC.
- (16) McKelvey, R.A., Wright, J.P., Honegger, J.L. and Warren, L.W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science vol. 58:1161-1174
- (17) Boutin, C.; Elmgaard, N. and Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology vol. 13(4): 349-369.
- (18) Boutin, C., and Rogers, C.A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides — An analysis with two databases. Ecotoxicology vol. 9(4):255-271.
- (19) Boutin, C. and Harper, J.L. (1991). A comparative study of the population dynamics of five species of Veronica in natural habitats. J. Ecol. 9:155-271.
- (20) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T.E., Batchelor, S.P. and Maguire, R.J. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532-2541.
- (21) OECD (2006). Draft Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (22) Hatzios, K.K. and Penner, D. (1985). Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. Rev. Weed Sci. 1:1-63.

-
- (23) Hamill, P.B., Marriage, P.B. and G. Friesen. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. *Weed Science* 25:386-389.
 - (24) Frans, R.E. and Talbert, R.E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. In: B. Truelove (Ed.) *Research Methods in Weed Science*, 2nd ed. Southern weed Science Society, Auburn, 15-23.
 - (25) Bruce, R.D. and Versteeg, D. J.(1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, 1485-1492.
 - (26) Capitolo C.33 del presente allegato: Prova sulla riproduzione dei lombrichi (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*).
-

Appendice 1

Definizioni

Principio attivo (o sostanza attiva): materiale destinato a provocare uno specifico effetto biologico (ad esempio lotta contro gli insetti, contro le malattie delle piante e contro le erbe infestanti nella superficie interessata dal trattamento), denominato anche principio attivo (o sostanza attiva) di grado tecnico.

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

Fitofarmaci, prodotti fitosanitari o pesticidi: materiali con una specifica attività biologica utilizzati intenzionalmente per proteggere le colture dai parassiti (quali ad esempio micosi, insetti e piante concorrenti).

EC_x (concentrazione efficace all'x %) o ER_x (tasso efficace all'x %): la concentrazione o il tasso che provoca un cambiamento o un'alterazione indesiderata pari all'x % nell'endpoint in esame rispetto al controllo (ad esempio, una riduzione del 25 % o del 50 % dell'emergenza delle plantule, dell'altezza dei germogli e del numero finale di piante presenti o un aumento del 25 % o del 50 % delle lesioni visibili corrispondono rispettivamente ai valori EC₂₅/ER₂₅ o EC₅₀/ER₅₀).

Emergenza: comparsa del coleottile o del cotiledone sulla superficie del terreno.

Formulazione: prodotto formulato commerciale contenente la sostanza attiva (principio attivo), chiamato anche preparato finale (¹) o prodotto finale tipico.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration — concentrazione minima a cui si osserva un effetto statisticamente significativo): la concentrazione più bassa della sostanza chimica in esame che produce un effetto. In questa prova, la concentrazione corrispondente alla LOEC ha un effetto statisticamente significativo ($p < 0,05$) in un dato periodo di esposizione rispetto al controllo ed è più alta del valore della NOEC.

Piante non bersaglio: piante esterne all'area che comprende le piante bersaglio. Per i fitofarmaci, tale termine si riferisce generalmente alle piante non comprese nella superficie interessata dal trattamento.

NOEC (No Observed Effect Concentration — concentrazione senza effetti osservabili): concentrazione più alta della sostanza chimica in esame alla quale non si osserva alcun effetto. In questa prova, la concentrazione corrispondente alla NOEC non ha alcun effetto statisticamente significativo ($p < 0,05$) in un dato periodo di esposizione rispetto al controllo.

Fitotossicità: variazioni dannose (secondo le misurazioni e le valutazioni visive) rispetto al normale aspetto e al normale modello di crescita delle piante in risposta all'esposizione a una determinata sostanza chimica.

Replica: unità sperimentale che rappresenta il gruppo di controllo e/o il gruppo di trattamento. In questi studi una replica corrisponde a un vaso.

Valutazione visiva: accertamento del danno visibile sulla base dell'osservazione dello stato della pianta, del suo vigore, della presenza di malformazioni, clorosi e necrosi e dell'aspetto complessivo rispetto al controllo.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata applicando il presente metodo di prova.

(¹) Preparato finale: prodotto formulato contenente la sostanza chimica attiva (principio attivo) disponibile in commercio.

Appendice 2

Elenco di specie storicamente utilizzate nelle prove sulle piante

Famiglia	Specie	Nomi comuni
DICOTYLEDONAE		
Apiaceae (Umbelliferae)	<i>Daucus carota</i>	Carota
Asteraceae (Compositae)	<i>Helianthus annuus</i>	Girasole
Asteraceae (Compositae)	<i>Lactuca sativa</i>	Lattuga
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Sinapis alba</i>	Senape bianca
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica campestris</i> var. <i>chinensis</i>	Cavolo cinese
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica napus</i>	Colza
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Cavolo cappuccio
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica rapa</i>	Rapa
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Lepidium sativum</i>	Crescione inglese
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Raphanus sativus</i>	Ravanello
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Barbabietola da zucchero
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	Cetriolo
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Glycine max</i> (<i>G. soja</i>)	Soia
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus aureus</i>	Fagiolo mungo
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fagiolo
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Pisum sativum</i>	Pisello
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Fieno greco
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Lotus corniculatus</i>	Ginestrino
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trifolium pratense</i>	Trifoglio rosso
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Vicia sativa</i>	Veccia
Linaceae	<i>Linum usitatissimum</i>	Lino
Polygonaceae	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Grano saraceno
Solanaceae	<i>Solanum lycopersicum</i>	Pomodoro

Famiglia	Specie	Nomi comuni
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amaryllidaceae)	<i>Allium cepa</i>	Cipolla
Poaceae (Gramineae)	<i>Avena sativa</i>	Avena
Poaceae (Gramineae)	<i>Hordeum vulgare</i>	Orzo
Poaceae (Gramineae)	<i>Lolium perenne</i>	Loglio perenne
Poaceae (Gramineae)	<i>Oryza sativa</i>	Riso
Poaceae (Gramineae)	<i>Secale cereale</i>	Segale
Poaceae (Gramineae)	<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgo da granella, sorgo gentile
Poaceae (Gramineae)	<i>Triticum aestivum</i>	Grano
Poaceae (Gramineae)	<i>Zea mays</i>	Mais

Appendice 3

Elenco di potenziali specie non coltivate

Potenziali specie secondo l'OCSE per le prove di tossicità sulle piante.

Nota: la seguente tabella fornisce informazioni su 52 specie non coltivate (i riferimenti sono riportati tra parentesi per ogni voce). I tassi di emergenza indicati provengono dalla letteratura pubblicata e sono forniti solo come indicazione generale. L'esperienza individuale può variare in base alla fonte dei semi e ad altri fattori.

FAMIGLIA Nome botanico della specie (nome comune in italiano)	Durata di vita (¹) e habitat	Peso dei semi (mg)	Fotoperiodo per la germinazione o la crescita (²)	Profondità di semina (mm) (³)	Tempi di germinazione (giorni) (⁴)	Trattamenti speciali (⁵)	Prova di tossicità (⁶)	Fornitori di semi (⁷)	Altri riferimenti (⁸)
APIACEAE <i>Torilis japonica</i> (lappolina petrosella)	A, B zone perturbate, siepi, pastura (16, 19)	1,7 — 1,9 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	stratificazione a freddo (7, 14, 18, 19) maturazione eventualmente necessaria (19) germinazione inibita dall'oscurità (1, 19) nessun trattamento speciale (5)	POST (5)		
ASTERACEAE <i>Bellis perennis</i> (pratolina)	P prateria, seminativi, terreno erboso (16, 19)	0,09-0,17 (4, 19)	L = D (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	germinazione non influenzata dall'irraggiamento (18, 19) nessun trattamento speciale (4, 14)	POST (4)	A, D, F	7
<i>Centaurea cyanus</i> (fiordaliso)	A campi, cigli stradali, habitat aperti (16)	4,1 -4,9 (4, 14)	L = D (14)	0-3 (2, 4, 14)	14-21 (100 %) (14)	nessun trattamento speciale (2, 4)	POST (2, 4)	A, D, E, F	7
<i>Centaurea nigra</i> (centaurea maggiore)	P campi, cigli stradali, habitat aperti (16, 19)	2,4-2,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	maturazione eventualmente necessaria (18, 19) germinazione inibita dall'oscurità (19) nessun trattamento speciale (5, 14, 26)	POST (5, 22, 26)	A	
<i>Inula helenium</i> (enula campana)	P zone umide, zone perturbate (16)	1 — 1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		nessun trattamento speciale (4)	POST (4)	A, F	

FAMIGLIA Nome botanico della specie (nome comune in italiano)	Durata di vita ⁽¹⁾ e habitat	Peso dei semi (mg)	Fotoperiodo per la germinazione o la crescita ⁽²⁾	Profondità di semina (mm) ⁽³⁾	Tempi di germinazione (giorni) ⁽⁴⁾	Trattamenti speciali ⁽⁵⁾	Prova di tossicità ⁽⁶⁾	Fornitori di semi ⁽⁷⁾	Altri riferimenti ⁽⁸⁾
<i>Leontodon hispidus</i> (dente di leone)	P campi, cigli stradali, zone perturbate (16, 19)	0,85 -1,2 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	germinazione inibita dall'oscurità (17, 18, 19), nessun trattamento speciale (5, 23)	POST (5, 22, 23)		
<i>Rudbeckia hirta</i> (Rudbeckia irta)	B, P zone perturbate (16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	nessun trattamento speciale (4, 14, 33)	POST (4, 33)	C, D, E, F	
<i>Solidago canadensis</i> (verga d'oro del Canada)	P pastura, spazi aperti (16)	0,06-0,08 (4, 14)	L = D (11)	0 (4)	14-21 (11)	mescolare con una quantità uguale di sabbia e immergere in GA da 500 ppm per 24 ore (11) nessun trattamento speciale (4)	POST (4)	E, F	
<i>Xanthium pensylvanicum</i> (lappola comune)	A campi, habitat aperti (16)	25-61 (14, 29)		0(1) 5(29)		la germinazione può essere inibita dall'oscurità (1) immergere in acqua calda per 12 ore (29)	PRE & POST (31)	A	
<i>Xanthium spinosum</i> (lappola spinosa)	A habitat aperti (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 (6)		scarificatura (14) nessun trattamento speciale (6)	PRE & POST (6)	A	
<i>Xanthium strumarium</i> (lappola italiana)	A campi, habitat aperti (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		nessun trattamento speciale (6, 14, 21)	PRE & POST (6, 21, 28, 31)	A	

FAMIGLIA Nome botanico della specie (nome comune in italiano)	Durata di vita ⁽¹⁾ e habitat	Peso dei semi (mg)	Fotoperiodo per la germinazione o la crescita ⁽²⁾	Profondità di semina (mm) ⁽³⁾	Tempi di germinazione (giorni) ⁽⁴⁾	Trattamenti speciali ⁽⁵⁾	Prova di tossicità ⁽⁶⁾	Fornitori di sementi ⁽⁷⁾	Altri riferimenti ⁽⁸⁾
BRASSICACEAE <i>Cardamine pratensis</i> (crescione dei prati)	P campi, cigli stradali, terreno erboso (16, 19)	0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	germinazione inibita dall'oscurità (18, 19) nessun trattamento speciale (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	
CARYOPHYLLACEAE <i>Lychnis flos-cuculi</i> (fior cuculo)	P (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	maturazione eventualmente necessaria (18) nessun trattamento speciale (5, 14, 15, 22-26)	POST (5, 15, 22-26)	F	
CHENOPodiACEAE <i>Chenopodium album</i> (chenopodio bianco)	A margini dei campi, zone perturbate (16, 19)	0,7 — 1,5 (14, 19, 34)	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	il trattamento varia a seconda del colore dei semi (19) dormienza in deposito asciutto (19) germinazione inibita dall'oscurità (1, 18, 19) stratificazione a freddo (18) nessun trattamento speciale (14, 34)	PRE & POST (28, 31, 34)	A	32
CLUSIACEAE <i>Hypericum perforatum</i> (erba di San Giovanni comune)	P campi, seminativi, habitat aperti (16, 19)	0,1-0,23 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	germinazione inibita dall'oscurità (1, 18, 19) nessun trattamento speciale (5, 14, 15, 25, 27)	POST (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE <i>Ipomoea hederacea</i> (campanelle viola)	A cigli stradali, habitat aperti, campi di mais (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10-20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	germinazione non influenzata dall'irraggiamento (1) nessun trattamento speciale (6, 21)	PRE & POST (6, 12, 21, 28)	A	
CYPERACEAE <i>Cyperus rotundus</i> (zigolo infestante)	P seminativi, pastura, cigli stradali (16, 30)	0,2 (14)	L = D (14)	0 (1) 10-20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	germinazione inibita dall'oscurità (1) nessun trattamento speciale (6, 10, 14)	PRE & POST (6, 28, 31)	B	7

FAMIGLIA Nome botanico della specie (nome comune in italiano)	Durata di vita ⁽¹⁾ e habitat	Peso dei semi (mg)	Fotoperiodo per la germinazione o la crescita ⁽²⁾	Profondità di semina (mm) ⁽³⁾	Tempi di germinazione (giorni) ⁽⁴⁾	Trattamenti speciali ⁽⁵⁾	Prova di tossicità ⁽⁶⁾	Fornitori di semi ⁽⁷⁾	Altri riferimenti ⁽⁸⁾
FABACEAE <i>Lotus corniculatus</i> (ginestrino)	P zone erborse, cigli stradali, habitat aperti (16, 19)	1-1,67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	scarificatura (14, 19) germinazione non influenzata dall'irraggiamento (18, 19) nessun trattamento speciale (23, 25)	POST (5, 23, 25)	A, D, E, F	
<i>Senna obtusifolia</i> (cassia obtusifolia)	A boschi umidi (16)	23-28 (9)	L = D (14) L > D (9)	10-20 (6,9)		immergere i semi in acqua per 24 ore (9) scarificatura (14) vitalità dei semi dipendente dal colore (1) nessun trattamento speciale (6)	POST (6,9)	A	
<i>Sesbania exaltata</i> (canapa)	A terreno alluvionale (16)	11 — 13 (9, 14)	L > D (9)	10-20 (9, 21)		immergere i semi in acqua per 24 ore (9) germinazione non influenzata dall'irraggiamento (1) nessun trattamento speciale (21)	PRE & POST (9, 21, 28, 31)	A	
<i>Trifolium pratense</i> (trifoglio rosso)	P campi, cigli stradali, seminativi (16, 19)	1,4 — 1,7 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	scarificatura (14, 18) maturazione eventualmente necessaria (19) germinazione non influenzata dall'irraggiamento (1, 19) nessun trattamento speciale (5)	POST (5)	A, E, F	
LAMIACEAE <i>Leonurus cardiaca</i> (cardiaca)	P spazi aperti (16)	0,75-1,0 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		nessun trattamento speciale (4, 14)	POST (4)	F	
<i>Mentha spicata</i> (menta verde)	P zone umide (16)	2,21 (4)		0 (4)		nessun trattamento speciale (4)	POST (4)	F	

FAMIGLIA Nome botanico della specie (nome comune in italiano)	Durata di vita ⁽¹⁾ e habitat	Peso dei semi (mg)	Fotoperiodo per la germinazione o la crescita ⁽²⁾	Profondità di semina (mm) ⁽³⁾	Tempi di germinazione (giorni) ⁽⁴⁾	Trattamenti speciali ⁽⁵⁾	Prova di tossicità ⁽⁶⁾	Fornitori di semi ⁽⁷⁾	Altri riferimenti ⁽⁸⁾
<i>Nepeta cataria</i> (erba gatta)	P zone perturbate (16)	0,54 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		nessun trattamento speciale (2, 4, 14)	POST (2,4)	F	
<i>Prunella vulgaris</i> (prunella comune)	P seminativi, zone erbose, zone perturbate (16, 19)	0,58-1,2 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	germinazione inibita dall'oscurità (18, 19) germinazione favorita da semi più grandi (1) nessun trattamento speciale (4, 14, 22)	POST (4, 22)	A, F	
<i>Stachys officinalis</i> (betonica comune)	P prateria, margini dei campi (19)	14-18 (14, 19)	L = D (14)		7 (50 %) (19)	nessun trattamento speciale (5, 14, 22)	POST (5, 22)	F	
MALVACEAE <i>Abutilón theophrasti</i> (cencio molle)	A campi, habitat aperti (16)	8,8 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	scarificatura (14) nessun trattamento speciale (5, 10, 21)	PRE & POST (6, 22, 28, 31)	A, F	
<i>Sida spinosa</i> (sida spinosa)	A campi, cigli stradali (16)	3,8 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		scarificatura (14) germinazione non influenzata dall'irraggiamento (1) nessun trattamento speciale (6, 21)	PRE & POST (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE <i>Papaver rhoeas</i> (papavero)	A campi, seminativi, zone perturbate (16, 19)	0,1-0,3 (4, 14, 19, 29)	L = D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	stratificazione a freddo e scarificatura (1, 19, 32) nessun trattamento speciale (4, 14, 29)	POST (4)	A, D, E, F, G	

FAMIGLIA Nome botanico della specie (nome comune in italiano)	Durata di vita ⁽¹⁾ e habitat	Peso dei semi (mg)	Fotoperiodo per la germinazione o la crescita ⁽²⁾	Profondità di semina (mm) ⁽³⁾	Tempi di germinazione (giorni) ⁽⁴⁾	Trattamenti speciali ⁽⁵⁾	Prova di tossicità ⁽⁶⁾	Fornitori di semi ⁽⁷⁾	Altri riferimenti ⁽⁸⁾
POACEAE <i>Agrostis tenuis</i> (agostide volgare)	prato, pastura (16)	0,07 (14)	L > D (10)	20 (10)	10 (62 %) (10)	germinazione inibita dall'oscurità (1, 17-19), nessun trattamento speciale (10)	POST (10)	A, E	
<i>Alopecurus myosuroides</i> (coda di volpe)	A campi, habitat aperti (16)	0,9-1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	scarificatura (14) trattare con 101 mg/L di KNO ₃ (14) stratificazione a caldo (1) germinazione inibita dall'oscurità (1) nessun trattamento speciale (34)	PRE & POST (28, 34)	A	32
<i>Avena fatua</i> (avena selvatica)	A aree coltivate, habitat aperti (16)	7-37,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10-20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	scarificatura (7, 32) germinazione inibita dall'oscurità (1) stratificazione a freddo (1, 18) nessun trattamento speciale (6, 10, 14)	PRE & POST (6, 10, 28, 31)	A	
<i>Bromus tectorum</i> (forasacco dei tetti)	A campi, cigli stradali, seminativi (16)	0,45-2,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		periodo di maturazione (1, 7, 32) germinazione inibita dalla luce (1) nessun trattamento speciale (14)	PRE & POST (28, 31)	A	
<i>Cynosurus cristatus</i> (covetta dei prati)	P campi, cigli stradali, habitat aperti (16, 19)	0,5-0,7 (14, 19, 29)	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	germinazione non influenzata dall'irraggiamento (19) nessun trattamento speciale (14, 29)	POST (5)	A	

FAMIGLIA Nome botanico della specie (nome comune in italiano)	Durata di vita ⁽¹⁾ e habitat	Peso dei semi (mg)	Fotoperiodo per la germinazione o la crescita ⁽²⁾	Profondità di semina (mm) ⁽³⁾	Tempi di germinazione (giorni) ⁽⁴⁾	Trattamenti speciali ⁽⁵⁾	Prova di tossicità ⁽⁶⁾	Fornitori di semi ⁽⁷⁾	Altri riferimenti ⁽⁸⁾
<i>Digitaria sanguinalis</i> (sanguinella comune)	A campi, terreno erboso, habitat aperti (16)	0,52-0,6 (14, 30)	L = D (14)	10-20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	scarificatura, stratificazione a freddo e maturazione (1, 7, 14, 32) trattare con 101 mg/L di KNO ₃ (14) germinazione inibita dall'oscurità (1) nessun trattamento speciale (21)	PRE & POST (18, 25, 31)	A	
<i>Echinochloa crusgalli</i> (panico selvatico)	A (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10-20 (7, 21)		scarificatura (7, 32) germinazione non influenzata dall'irraggiamento (1) nessun trattamento speciale (3, 14, 21)	PRE & POST (3, 21, 28, 31)	A	
<i>Elymus canadensis</i> (segale selvatica canadese)	P zone riparie, zone perturbate (16)	4-5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14-28 (11)	nessun trattamento speciale (2, 11)	POST (2)	C, D, E	
<i>Festuca pratensis</i> (festuca)	P campi, zone umide (16, 19)	1,53-2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	nessun trattamento speciale (10, 19)	POST (10)	A	7
<i>Hordeum pusillum</i> (orzo piccolo)	A pastura, cigli stradali, habitat aperti (16)	3,28 (14)				stratificazione a caldo (1) germinazione non influenzata dall'irraggiamento (1)	PRE (31)		7
<i>Phleum pratense</i> (coda di topo, fleolo)	P pastura, seminativi, zone perturbate (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0-10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	germinazione inibita dall'oscurità (19) germinazione non influenzata dall'irraggiamento (17) nessun trattamento speciale (10, 14, 17, 19)	POST (10)	A, E	

FAMIGLIA Nome botanico della specie (nome comune in italiano)	Durata di vita ⁽¹⁾ e habitat	Peso dei semi (mg)	Fotoperiodo per la germinazione o la crescita ⁽²⁾	Profondità di semina (mm) ⁽³⁾	Tempi di germinazione (giorni) ⁽⁴⁾	Trattamenti speciali ⁽⁵⁾	Prova di tossicità ⁽⁶⁾	Fornitori di semi ⁽⁷⁾	Altri riferimenti ⁽⁸⁾
POLYGONACEAE <i>Polygonum convolvulus</i> (convolvolo nero)	A habitat aperti, cigli stradali (16)	5-8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0-2 (4, 29)		stratificazione a freddo per 4-8 settimane (1, 2, 4, 20, 29) germinazione non influenzata dall'irraggiamento (1)	PRE & POST 1, 2, 20, 28, 31	A	32
<i>Polygonum lapathifolium</i> (persicaria maggiore)	A terreno umido (16)	1,8-2,5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18)	germinazione non influenzata dall'irraggiamento (1) germinazione inibita dall'oscurità (18) stratificazione a freddo (1) nessun trattamento speciale (5)	PRE & POST (6)	A, E	
<i>Polygonum pensylvanicum</i> (poligono della Pennsylvania)	A campi, habitat aperti (16)	3,6-7 (14, 29)		2 (29)		stratificazione a freddo per 4 settimane a 0-5 °C (1, 29) germinazione inibita dall'oscurità (1)	PRE (31)	A, E	
<i>Polygonum persicaria</i> (poligono persicaria, persicaria maculosa)	A zone perturbate, semi-nativi (16, 19)	2,1 -2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	scarificatura, stratificazione a freddo, trattamento con GA (14) stratificazione a freddo, maturazione (17-19) germinazione inibita dall'oscurità (19) nessun trattamento speciale (13)	POST (13)	A	32
<i>Rumex crispus</i> (romice crespa)	P seminativi, cigli stradali, spazi aperti (16, 19)	1,3-1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	germinazione inibita dall'oscurità (18, 19) maturazione eventualmente necessaria (18) nessun trattamento speciale (4, 14, 33)	POST (4, 33)	A, E	32

FAMIGLIA Nome botanico della specie (nome comune in italiano)	Durata di vita ⁽¹⁾ e habitat	Peso dei semi (mg)	Fotoperiodo per la germinazione o la crescita ⁽²⁾	Profondità di semina (mm) ⁽³⁾	Tempi di germinazione (giorni) ⁽⁴⁾	Trattamenti speciali ⁽⁵⁾	Prova di tossicità ⁽⁶⁾	Fornitori di semi ⁽⁷⁾	Altri riferimenti ⁽⁸⁾
PRIMULACEAE <i>Anagallis arvensis</i> (centonchio)	A seminativi, spazi aperti, zone perturbate (16, 19)	0,4-0,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	stratificazione a freddo, trattamento con GA (1,14, 18, 19, 32) la germinazione richiede la luce (1) nessun trattamento speciale (2, 4)	POST (2, 4)	A, F	
RANUNCULACEAE <i>Ranunculus acris</i> (ranuncolo comune)	P seminativi, cigli stradali, spazi aperti (16, 19)	1,5-2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41 -56 (19, 29)	nessun trattamento speciale (5, 14, 22, 24 -26)	POST (5, 22, 24-26)		32
ROSACEAE <i>Geum urbanum</i> (cariofillata comune)	P siepi, zone umide (16, 19)	0,8-1,5 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	germinazione inibita dall'oscurità (18, 19) stratificazione a caldo (1) nessun trattamento speciale (5, 14, 22, 25, 26)	POST (5, 22, 25, 26)	A	
RUBIACEAE <i>Galium aparine</i> (aparine)	A seminativi, zone umide, zone perturbate (16, 19)	7-9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	stratificazione a freddo (1, 18, 19) germinazione non influenzata dall'irraggiamento (18, 19) germinazione inibita dalla luce (1) nessun trattamento speciale (6, 14)	PRE & POST (6, 28)	A	32
<i>Galium mollugo</i> (caglio comune)	P scarpate, spazi aperti (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		nessun trattamento speciale (5, 14, 22, 24, 26, 29)	POST (5, 22, 24, 26)	A	
SCROPHULARIACEAE <i>Digitalis purpurea</i> (digitale purpurea)	B, P siepi, spazi aperti (16, 19)	0,1-0,6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	germinazione inibita dall'oscurità (1,17-19) nessun trattamento speciale (4, 22-26)	POST (4, 22 — 26)	D, G, F	

FAMIGLIA Nome botanico della specie (nome comune in italiano)	Durata di vita ⁽¹⁾ e habitat	Peso dei semi (mg)	Fotoperiodo per la germinazione o la crescita ⁽²⁾	Profondità di semina (mm) ⁽³⁾	Tempi di germinazione (giorni) ⁽⁴⁾	Trattamenti speciali ⁽⁵⁾	Prova di tossicità ⁽⁶⁾	Fornitori di semi ⁽⁷⁾	Altri riferimenti ⁽⁸⁾
<i>Veronica persica</i> (veronica)	A seminativi, spazi aperti, zone perturbate (16, 19)	0,5-0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3(19) 5 (96 %) (18)	germinazione inibita dall'oscurità (18, 19) stratificazione a freddo (18) nessun trattamento speciale (14)	PRE & POST (28)	A	32

⁽¹⁾ A = annuali, B = biennali, P = perenni.

⁽²⁾ I riferimenti 11,14 e 33 si riferiscono alla percentuale di luce (L) e di oscurità (D) richiesta per la germinazione dei semi. I riferimenti 3, 6, 9, 10, 13 e 20 si riferiscono alle condizioni colturali nelle serre.

⁽³⁾ 0 mm indica che i semi sono seminati sulla superficie del terreno o che hanno bisogno di luce per germinare.

⁽⁴⁾ I numeri indicati si riferiscono al numero di giorni in cui germina una determinata percentuale di semi secondo il riferimento fornito, ad esempio germinazione di 3 giorni (50 %) (riferimento 19).

⁽⁵⁾ Tempi di maturazione e/o dati sulla stratificazione non sempre disponibili. Ad eccezione dei casi in cui è richiesto un trattamento a freddo, le condizioni di temperatura non sono specificate poiché nelle prove in serra il controllo della temperatura è limitato. La maggior parte dei semi germina nelle normali fluttuazioni di temperatura che si verificano nelle serre.

⁽⁶⁾ Indica che una specie è stata utilizzata in una prova di tossicità degli erbicidi sulle piante preemergenza (PRE) e/o postemergenza (POST).

⁽⁷⁾ Fornisce esempi di fornitori di semi commerciali.

⁽⁸⁾ Fornisce due riferimenti alternativi consultati.

Fornitori di semi citati

ID fornitore	Informazioni sul fornitore
A	Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ ENGLAND +44 (0) 1189 349 464 www.herbiseed.com
B	Tropilab Inc. 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948 USA (727) 344 — 4050 www.tropilab.com
C	Pterophylla — Native Plants & Seeds #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0 CANADA (519) 586 — 3985
D	Applewood Seed Co. 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002 USA (303) 431 — 7333 www.applewoodseed.com
E	Ernst Conservation Seeds 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335 USA (800) 873 — 3321 www.ernstseed.com
F	Chiltern Seeds Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB ENGLAND +44 1229 581137 www.chiltemseeds.co.uk
G	Thompson & Morgan P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 CANADA (800) 274 — 7333 www.thompson-morgan.com

RIFERIMENTI CITATI

- (1) Baskin, C.C. & Baskin, J.M. 1998. Seeds. Academic Press, Toronto
- (2) Blackburn, L.G. & Boutin, C. 2003. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-Up®). Ecotoxicology, 12:271-285.
- (3) Boutin, C., Lee, H-B., Peart, T., Batchelor, P.S., & Maguire, R.J. 2000. Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Environmental Toxicology & Chemistry, 19(10):2532-2541.
- (4) Boutin, C., Elmgaard, N., & Kjaer, C. 2004. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment. Ecotoxicology, 13:349-369.
- (5) Breeze, V., Thomas, G., & Butler, R. 1992. Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. Annals of Applied Biology, 121:669-677.
- (6) Brown, R.A., & Farmer, D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. In: Plants for toxicity assessment: 2nd volume. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang e M.A. Lewis, eds. American Society for Testing & Materials, Philadelphia, pagg. 197-208.

- (7) Buhler, D.D. & Hoffman, M.L. 1999. *Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants*. Weed Science Society of America, Lawrence, K.
- (8) Clapham, A.R., Tutin, T.G., & Warburg, E.F. 1981. *Excursion flora of the British Isles*, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge
- (9) Clay, P.A. & Griffin, J.L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. *Weed Science*, 48:481-486.
- (10) Cole, J.F.H. & Canning, L. 1993. Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. BCPC — Weeds. pagg. 151-156.
- (11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Personal communication. (www.ernstseed.com)
- (12) Fletcher, J.S., Johnson, F.L., & McFarlane, J.C. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 9:769-776.
- (13) Fletcher, J.S., Pfleeger, T.G., Ratsch, H.C., & Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 15(7):1189-1196.
- (14) Flynn, S., Turner, R.M., & Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, ottobre 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbge.org.uk/data/sid)
- (15) Franzaring, J., Kempenaar, C., & van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. *Environmental Pollution*, 114:21-28.
- (16) Gleason, H.A. & Cronquist, A. 1991. *Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada*, seconda edizione. New York Botanical Garden, Bronx, NY
- (17) Grime, J.P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. *Annals of Applied Biology*, 98:555-558.
- (18) Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M., & Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. *Journal of Ecology*, 69:1017-1059.
- (19) Grime, J.P., Hodgson, J.G., & Hunt, R. 1988. *Comparative plant ecology: a functional approach to common British species*. Unwin Hyman Ltd., London
- (20) Kjaer, C. 1994. Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (*Polygonum convolvulus* L.). *Weed Research*, 34:453-459.
- (21) Klingaman, T.E., King, C.A., & Oliver, L.R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. *Weed Science*, 40:227-232.
- (22) Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. *Environmental Pollution*, 59:71-86.
- (23) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. *Environmental Pollution*, 69:223-235.
- (24) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. *Environmental Pollution*, 73:25-42.
- (25) Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., & Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. *Agriculture, Ecosystems, & Environment*, 45:283-293.

-
- (26) Marrs, R.H. & Frost, A.J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. *Journal of Environmental Management*, 50:369-388.
 - (27) Marshall, E.J.P. & Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. BCPC — Weeds. pagg. 1021-1028.
 - (28) McKelvey, R.A., Wright, J.P., & Honegger, J.L. 2002. A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. *Pest Management Science*, 58:1161-1174.
 - (29) Morton, S. (Herbiseed). 2004. Personal communication. (<http://www.herbiseed.com>)
 - (30) USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, version 3.5. (<http://plants.usda.gov>). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA
 - (31) USEPA. 1999. One-Liner Database. [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].
 - (32) Webster, R.H. 1979. Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.
 - (33) White, A. L. & Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Personal communication.
 - (34) Zwerger, P. & Pestemer, W. 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. *Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh.*, 17:711-718.
-

Appendice 4

Esempi di condizioni culturali appropriate per determinate specie coltivate

Le seguenti condizioni si sono rivelate idonee per 10 specie coltivate e possono essere utilizzate come riferimento anche per le prove su altre specie eseguite in laboratori fitologici:

Concentrazione di biossido di carbonio: 350 ± 50 ppm;

Umidità relativa: 70 ± 5 % durante i periodi di luce e 90 ± 5 % durante i periodi di oscurità;

Temperatura: 25 ± 3 °C durante il giorno, 20 ± 3 °C durante la notte;

Fotoperiodo: 16 ore di luce/8 ore di oscurità, presupponendo una lunghezza d'onda media di 400-700 nm;

Luce: luminanza di 350 ± 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, misurata al di sopra del fogliame.

Le specie coltivate sono le seguenti:

- pomodoro (*Solanum lycopersicon*);
 - cetriolo (*Cucumis sativus*);
 - lattuga (*Lactuca sativa*);
 - soia (*Glycine max*);
 - cavolo cappuccio (*Brassica oleracea* var. *capitata*);
 - carota (*Daucus carota*);
 - avena (*Avena sativa*);
 - loglio perenne (*Lolium perenne*);
 - mais (*Zea mays*);
 - cipolla (*Allium cepa*).
-

C.32. PROVA DI RIPRODUZIONE SU ENCHITREIDI

INTRODUZIONE

- Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 220 (2004). Esso è finalizzato a valutare gli effetti delle sostanze chimiche sulla riproduzione degli Enchitreidi, *Enchytraeus albidus* (Henle 1873) nel terreno. Si basa principalmente su un metodo messo a punto dall'Umweltbundesamt (Germania) (1) che è stato sottoposto a prove interlaboratorio (2). Sono stati presi in considerazione anche altri metodi di valutazione della tossicità delle sostanze chimiche sugli Enchitreidi e i lombrichi (3)(4)(5)(6)(7)(8).

CONSIDERAZIONI INIZIALI

- Gli anellidi del suolo del genere *Enchytraeus* sono specie ecologicamente adatte per le prove ecotossicologiche. Benché spesso presenti nei terreni in cui vivono i lombrichi, gli Enchitreidi sono spesso però molto diffusi anche in terreni da cui i lombrichi sono assenti. Gli Enchitreidi possono essere utilizzati in prove di laboratorio come pure in studi sul campo e in semicampo. Da un punto di vista pratico numerose specie di *Enchytraeus* sono facili da manipolare e da allevare e il loro tempo di moltiplicazione è significativamente inferiore a quello dei lombrichi. La durata di una prova di riproduzione con gli Enchitreidi è pertanto di sole 4-6 settimane, mentre nel caso dei lombrichi (*Eisenia fetida*) è di 8 settimane.
- Nozioni di base di tipo ecologico e ecotossicologico sugli Enchitreidi in ambiente terrestre figurano nei riferimenti (9)(10)(11)(12).

PRINCIPIO DELLA PROVA

- Gli Enchitreidi adulti sono esposti a una gamma di concentrazioni della sostanza chimica in esame mescolata in un terreno artificiale. La prova può essere divisa in due fasi: a) una prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni, qualora non siano disponibili informazioni sufficienti, in cui la mortalità costituisce il principale risultato esaminato dopo due settimane di esposizione e b) la prova di riproduzione propriamente detta in cui sono valutati la consistenza totale della progenie per animale riproduttore e la sopravvivenza degli animali riproduttori. La durata complessiva della prova è di sei settimane. Dopo tre settimane vengono rimossi gli esemplari adulti e ne sono registrati i cambiamenti morfologici. Al termine delle tre settimane successive viene contata la progenie nata dai bozzoli prodotti dagli adulti. Il tasso di riproduzione degli animali esposti alla sostanza chimica in esame è confrontato con il o i gruppi di controllo per determinare i) la concentrazione senza effetti osservati (NOEC) e/o ii) l'EC_x (ad esempio, EC₁₀, EC₅₀) utilizzando un modello di regressione per stimare la concentrazione che causerebbe una riduzione percentuale x del tasso di riproduzione. Le concentrazioni di prova devono comprendere l'EC_x (e.g. EC₁₀, EC₅₀) in modo che l'EC_x sia ottenuta per interpolazione anziché per estrapolazione.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA CHIMICA IN ESAME

- È auspicabile conoscere l'idrosolubilità, il log K_{ow}, il coefficiente di ripartizione nel terreno (ad esempio, capitoli C.18 o C.19 del presente allegato) e la tensione di vapore della sostanza chimica in esame. È auspicabile anche l'acquisizione di informazioni supplementari sul destino della sostanza chimica in esame nel terreno, quali i tassi di fotolisi e di idrolisi.
- Il presente metodo di prova può essere usato per sostanze chimiche solubili o insolubili in acqua. Ciò che cambia sono tuttavia le modalità di applicazione della sostanza chimica in esame. Il metodo di prova non è applicabile alle sostanze chimiche volatili, ovvero alle sostanze chimiche per le quali la costante di Henry o il coefficiente di ripartizione aria/acqua sono maggiori di uno o alle sostanze chimiche per le quali la tensione di vapore è superiore a 0,0133 Pa a 25 °C.

VALIDITÀ DELLA PROVA

- Perché la prova sia valida, nei gruppi di controllo devono essere soddisfatti i seguenti criteri di prestazione:
 - la mortalità degli esemplari adulti non deve superare il 20 % al termine della prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni e dopo le prime tre settimane della prova di riproduzione;
 - se per la prova sono stati utilizzati 10 esemplari adulti per recipiente, alla fine della prova la progenie deve essere pari ad almeno una media di 25 esemplari per recipiente;
 - il coefficiente di variazione relativamente alla consistenza media della progenie non deve essere superiore al 50 % alla fine della prova di riproduzione.

Una prova che non soddisfi i criteri suesposti non deve essere proseguita, a meno che non sia possibile giustificare una sua continuazione. La giustificazione va allegata alla relazione sulla prova.

SOSTANZA CHIMICA DI RIFERIMENTO

8. È necessario sottoporre a prova una sostanza chimica di riferimento a intervalli regolari o, eventualmente, inserirla in ciascuna prova per verificare che la reazione degli organismi di prova non cambi significativamente nel corso del tempo. A tal fine una sostanza chimica di riferimento adeguata è il carbendazim, che ha effetti dimostrati sulla sopravvivenza e la riproduzione degli Enchitreidi (13)(14), o anche altre sostanze chimiche i cui dati sulla tossicità siano ben noti. In una prova interlaboratorio (2) è stata utilizzata una formulazione di carbendazim, nota con il nome commerciale di Derosal™ della società AgrEvo (Francoforte, Germania), contenente 360 g/l (32,18 %) di principio attivo. L'EC₅₀ per la riproduzione determinata nella prova interlaboratorio si situava nella gamma 1,2 ± 0,8 mg di principio attivo per kg di massa secca (2). Se nella serie di prove è incluso uno standard di tossicità positivo, viene utilizzata una sola concentrazione e il numero delle repliche deve essere uguale a quello dei gruppi di controllo. Per il carbendazim, si raccomanda di sottoporre a prova 1,2 mg di principio attivo per kg peso a secco (saggiato in formulazione liquida).

DESCRIZIONE DELLA PROVA

Apparecchiatura

9. I recipienti per la prova devono essere di vetro o di altro materiale chimicamente inerte. Sono adeguati recipienti di vetro (ad esempio, volume: 0,20 - 0,25 litro; diametro: ≈ 6 cm), muniti di coperchi trasparenti (ad esempio di vetro o di polietilene) progettati per ridurre l'evaporazione dell'acqua, consentendo al contempo gli scambi gassosi tra il terreno e l'atmosfera. I coperchi devono essere trasparenti per consentire la trasmissione della luce.
10. L'esperimento richiede un'apparecchiatura normale di laboratorio, nello specifico:
 - una camera di essiccazione;
 - un microscopio stereoscopico;
 - un pH-metro e un fotometro;
 - bilance di precisione adeguata;
 - attrezzature adeguate per il controllo della temperatura;
 - attrezzature adeguate per il controllo dell'umidità (non essenziali se i recipienti per l'esposizione sono muniti di coperchi);
 - un'incubatrice o stanzetta con aria condizionata;
 - pinzette, ami o anse;
 - una bacinella per uso fotografico.

Preparazione del terreno artificiale

11. In questa prova è utilizzato un terreno artificiale (5)(7) che presenta la seguente composizione (sulla base del peso a secco, con essiccazione fino al raggiungimento di un peso costante a 105 °C):
 - 10 % di torba di spagno essiccata all'aria e finemente macinata (è accettabile una dimensione delle particelle di 2 ± 1 mm); si raccomanda di verificare che il terreno preparato con un nuovo lotto di torba sia adatto per l'allevamento dei lombrichi prima di essere utilizzato nella prova;
 - 20 % di argilla caolinica (tenore di caolini di preferenza superiore al 30 %);

- tra lo 0,3 e l'1,0 % circa di carbonato di calcio (CaCO_3 , polverizzato, al grado analitico) per ottenere un pH di $6,0 \pm 0,5$; il quantitativo di carbonato di calcio da aggiungere può dipendere principalmente dalla qualità/natura della torba;
- circa il 70 % di sabbia di quarzo essiccati all'aria (in funzione del quantitativo di CaCO_3 necessario), in prevalenza sabbia fine con più del 50 % delle particelle di dimensioni comprese tra 50 e 200 micron.

Prima di utilizzare il terreno artificiale nella prova, è opportuno dimostrarne l'adeguatezza per l'allevamento dei vermi e il rispetto dei criteri di validità della prova. Si raccomanda in particolare di effettuare un tale controllo per accertarsi che i risultati della prova non siano compromessi in caso di riduzione del tenore di carbonio organico del terreno artificiale, ad esempio riducendo il tenore di torba al 4-5 % e aumentando conseguentemente il tenore di sabbia. Con una tale riduzione del tenore di carbonio organico, possono diminuire le possibilità di assorbimento della sostanza chimica in esame nel terreno (carbonio organico) e aumentare la disponibilità della sostanza chimica in esame per i vermi. È stato dimostrato che l'*Enchytraeus albidus* può soddisfare i criteri di validità relativi alla riproduzione quando testato in terreni naturali con un tenore di carbonio organico inferiore a quello sopramenzionato, ad esempio 2,7 % (15), ed è stato sperimentalmente constatato — per quanto in misura limitata — che ciò vale anche con un terreno artificiale contenente il 5 % di torba.

Nota: Anche quando si utilizza terreno naturale in ulteriori prove (ad esempio, sperimentazioni di livello più elevato), deve essere dimostrata l'adeguatezza del terreno e il rispetto dei criteri di validità della prova.

12. I componenti secchi del terreno sono accuratamente mescolati (ad esempio in un grande miscelatore da laboratorio), operazione che deve essere eseguita almeno una settimana prima dell'inizio della prova. La miscela di terreno va conservata per due giorni allo scopo di equilibrarne/stabilizzarne l'acidità. Per determinare il pH si miscela il terreno con una soluzione di 1 M di cloruro di potassio (KCl) o 0,01 M di cloruro di calcio (CaCl_2) in proporzione di 1 a 5 (cfr. (16) e appendice 3). Se l'acidità del suolo è superiore a quella della gamma prevista (cfr. paragrafo 11), può essere corretta aggiungendovi un quantitativo adeguato di CaCO_3 . Se il terreno è troppo alcalino, può essere riequilibrato aggiungendo un quantitativo superiore della miscela di cui al paragrafo 11, ma escludendo il CaCO_3 .
13. La capacità massima di ritenzione idrica (WHC) del terreno artificiale è determinata in base alle procedure illustrate nell'appendice 2. Uno o due giorni prima dell'inizio della prova, il terreno artificiale secco è preumidificato aggiungendo acqua deionizzata in quantità sufficiente a ottenere circa la metà del tenore di acqua finale, ovvero tra il 40 % e il 60 % della capacità massima di ritenzione idrica. All'inizio della prova il terreno preumidificato è suddiviso in porzioni corrispondenti al numero delle concentrazioni di prova (e, se del caso, alla sostanza chimica di riferimento) e dei gruppi di controllo utilizzati nella prova. Il tenore di umidità è adeguato al 40 %-60 % della capacità massima di ritenzione idrica aggiungendo la soluzione della sostanza chimica in esame e/o acqua distillata o deionizzata (cfr. paragrafi 19-21). Il tenore di umidità viene misurato all'inizio e alla fine della prova (con essiccazione fino al raggiungimento di un peso costante a 105 °C) e deve situarsi nella gamma ottimale per la sopravvivenza degli animali. Un esame sommario del tenore di umidità del terreno può essere fatto stringendo leggermente in mano un pugno di terreno: se il tenore di umidità è corretto, tra le dita dovrebbero comparire goccioline d'acqua.

Selezione e preparazione degli animali per la prova

14. La specie consigliata per questa prova è *Enchytraeus albidus* (Henle 1837 — verme bianco), della famiglia *Enchytraeidae* (ordine *Oligochaeta*, phylum *Annelida*). *E. albidus* è una delle specie di Enchitreidi più diffuse, con esemplari di lunghezza documentata fino a 35 mm (17)(18). *E. albidus* è una specie con distribuzione mondiale e si ritrova in ambiente marino, di acqua dolce e terrestre, principalmente nella materia organica in putrefazione (aliche, compost) e, raramente, nei terreni prativi (9). L'ampia tolleranza ecologica che caratterizza questa specie e alcune sue variazioni morfologiche indica che potrebbero esisterne varie razze.
15. L'*E. albidus* è reperibile in commercio, sotto forma di mangime per pesci. Occorre verificare se l'allevamento è contaminato da altre specie, generalmente più piccole (1) (19), nel qual caso tutti gli animali vanno lavati con acqua in una capsula Petri. Per avviare un nuovo allevamento, si scelgono (utilizzando un microscopio stereoscopico) gli esemplari adulti di grandi dimensioni di *E. albidus* e si scartano tutti gli altri. L'*E. albidus* può essere allevato facilmente in un'ampia gamma di materiali organici (cfr. appendice 4). Il ciclo di vita dell'*E. albidus* è breve, dato che raggiunge la maturità in un tempo oscillante tra 33 (a 18 °C) e 74 giorni (a 12 °C) (1). Per questa prova possono essere utilizzati solo gli animali tenuti in laboratorio per almeno 5 settimane (una generazione) e che non abbiano mostrato complicazioni.

16. Per la prova sono adatte anche altre specie del genere *Enchytraeus*, ad esempio *E. buchholzi* (Vejdovsky 1879) o *E. crypticus* (Westheide & Graefe 1992) (cfr. appendice 5). Se si impiegano altre specie di *Enchytraeus* occorre identificarle in modo chiaro e giustificare tale scelta nella relazione.
17. Tutti gli animali impiegati nella prova devono essere esemplari adulti, devono portare uova (punti bianchi) nella regione del clitello e avere grosso modo le stesse dimensioni (lunghezza di circa 1 cm). La sincronizzazione della coltura di allevamento non è necessaria.
18. Se gli Enchitreidi non sono allevati nello stesso tipo di terreno e alle condizioni (compresa l'alimentazione) utilizzate nella prova propriamente detta, essi devono essere acclimatati per un periodo che va da 24 ore a tre giorni. All'inizio è necessario acclimatare un numero di esemplari adulti superiore a quello necessario per l'esecuzione della prova per tenere conto della necessità di scartare esemplari con lesioni o inutilizzabili per altre ragioni. Alla fine del periodo di acclimatazione sono selezionati per la prova solo gli esemplari recanti uova e che non esibiscono anomalie comportamentali (come, ad esempio, cercare di uscire dal terreno). Gli animali sono rimossi con attenzione utilizzando pinzette da orafo, ami o anse e sono messi in una capsula Petri contenente un piccolo quantitativo di acqua dolce. A tal fine è preferibile utilizzare acqua dolce artificiale come proposto nel capitolo C.20 del presente allegato (prova sulla riproduzione della *Daphnia magna*), in quanto l'acqua deionizzata, demineralizzata o del rubinetto potrebbe essere nociva per gli animali. Gli animali sono analizzati con un microscopio stereoscopico, scartando quelli che non contengono uova. Si deve prestare particolare cura a rimuovere e scartare eventuali acari o Collemboli che potrebbero aver infettato le colture. Gli animali sani non utilizzati per la prova devono essere reimmessi nella coltura madre.

Preparazione delle concentrazioni di prova

Sostanza chimica in esame solubile in acqua

19. Viene preparata una soluzione della sostanza chimica in esame in acqua deionizzata in quantità sufficiente per tutte le repliche di una concentrazione di prova. Si raccomanda di utilizzare un quantitativo di acqua adeguato per raggiungere il tenore di umidità richiesto, ovvero tra il 40 % e 60 % della capacità massima di ritenzione idrica (cfr. paragrafo 13). Ciascuna soluzione della sostanza chimica in esame è adeguatamente miscelata con un lotto di terreno preumidificato prima di essere introdotta nel recipiente di prova.

Sostanza chimica in esame insolubile in acqua

20. Nel caso di sostanze chimiche insolubili in acqua ma solubili nei solventi organici, la sostanza chimica in esame può essere discolta nel minor volume possibile di un mezzo disperdente adeguato (per esempio, acetone). A tal fine devono essere utilizzati esclusivamente solventi volatili. Il mezzo disperdente viene nebulizzato oppure mescolato con un piccolo quantitativo, ad esempio 2,5 grammi, di sabbia di quarzo fine. Il mezzo disperdente è eliminato per evaporazione sotto una cappa chimica per almeno un'ora. La miscela di sabbia di quarzo e della sostanza chimica in esame è incorporata al terreno preumidificato, mescolando a fondo dopo l'aggiunta della quantità necessaria di acqua deionizzata per raggiungere il grado di umidità richiesto. La miscela finale è distribuita nei recipienti di prova.
21. Per le sostanze poco solubili in acqua e nei solventi organici, è possibile mescolare alla quantità di sostanza chimica in esame l'equivalente di 2,5 g di sabbia di quarzo finemente macinata per recipiente di prova per ottenere la concentrazione sperimentale voluta. La miscela di sabbia di quarzo e della sostanza chimica in esame è incorporata al terreno preumidificato, mescolando a fondo dopo l'aggiunta della quantità necessaria di acqua deionizzata per raggiungere il tenore di umidità richiesto. La miscela finale è distribuita nei recipienti di prova. La procedura è ripetuta per ogni concentrazione di prova preparando anche un adeguato gruppo di controllo.
22. Di norma le sostanze chimiche non devono essere sottoposte a prova a concentrazioni superiori a 1 000 mg/kg di massa secca di terreno. La prova a concentrazioni superiori può essere tuttavia necessaria in funzione degli obiettivi di una prova specifica.

ESECUZIONE DELLE PROVE

Gruppi di prova e di controllo

23. Per ciascuna concentrazione di prova viene distribuito nel recipiente di prova (cfr.paragrafi 19-21) un quantitativo di terreno di prova corrispondente a 20 g di peso secco. Vengono inoltre preparati i recipienti di controllo privi della sostanza chimica in esame. In ciascun recipiente sono aggiunti gli alimenti in conformità

alle procedure di cui al paragrafo 29. In ciascun recipiente sono distribuiti dieci animali scelti a caso. Gli animali sono deposti con cautela sulla superficie del terreno in ciascun recipiente di prova utilizzando, ad esempio, pinzette da orafa, ami o anse. Il numero di repliche per le concentrazioni di prova e i controlli dipende dal tipo di prova utilizzato (cfr. paragrafo 34). I recipienti di prova sono posizionati a caso nell'incubatrice di prova e tali posizioni sono cambiate, sempre a caso, con cadenza settimanale.

24. Se per l'applicazione della sostanza chimica in esame si utilizza un mezzo disperdente, occorre allestire, oltre alla serie di prova, una serie di controllo contenente sabbia di quarzo nebulizzata o mescolata con un solvente. La concentrazione del solvente o disperdente deve essere la stessa di quella utilizzata nei recipienti di prova contenenti la sostanza chimica in esame. Una serie di controllo contenente ulteriore sabbia di quarzo (2,5 g per recipiente) deve essere allestita per le sostanze chimiche che richiedono una somministrazione in conformità con le procedure di cui al paragrafo 21.

Condizioni di prova

25. La temperatura di prova è di 20 ± 2 °C. Per scoraggiare gli animali a uscire dal terreno, le prove sono condotte sulla base di un fotoperiodo controllato di luce/buio (di preferenza 16 ore di luce e 8 ore di buio) con un'intensità luminosa compresa tra 400 e 800 lux nella zona dei recipienti di prova.
26. Al fine di verificare l'umidità del terreno, i recipienti sono pesati all'inizio della prova e successivamente una volta alla settimana. La perdita di peso è compensata con l'aggiunta di un quantitativo adeguato di acqua deionizzata. Va rilevato che la perdita di peso può essere ridotta mantenendo un'elevata umidità atmosferica (> 80 %) nell'incubatrice di prova.
27. Il tenore di umidità e il pH devono essere misurati all'inizio della prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni e all'inizio della prova vera e propria. Le misurazioni sono effettuate in campioni dei terreni di controllo e trattati (per tutte le concentrazioni) preparati e mantenuti nello stesso modo delle colture di prova ma non contenenti animali. Gli alimenti vengono aggiunti a tali campioni soltanto all'inizio della prova per facilitare l'attività microbica e in quantitativi identici a quelli aggiunti alle colture di prova. Non è necessario aggiungere ulteriori alimenti in tali recipienti durante la prova.

Alimentazione

28. Per l'alimentazione può essere usato un mangime in grado di mantenere la popolazione di Enchitreidi; l'esperienza ha dimostrato che i fiocchi di avena, di preferenza sterilizzati in autoclave (o riscaldati) prima dell'uso per evitare la contaminazione microbica, costituiscono un alimento adeguato.
29. All'inizio il mangime è somministrato miscelando 50 mg di fiocchi di avena macinati con il terreno di ciascun recipiente prima di introdurvi gli animali. In seguito il mangime è somministrato quotidianamente fino al 21° giorno. Il 28° giorno non viene aggiunto mangime poiché in questa fase gli esemplari adulti sono già stati rimossi e quelli appena nati hanno bisogno di relativamente poco cibo in più a partire da quel momento. L'alimentazione durante la prova prevede 25 mg di fiocchi di avena macinati per contenitore che devono essere sparsi con attenzione sulla superficie del terreno per evitare di recare danno agli animali. Per ridurre la comparsa di funghi, i fiocchi di avena devono essere interrati e ricoperti di un leggero strato di terreno. Se non tutto il mangime viene consumato, si deve diminuire la razione.

Concezione della prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni

30. Se necessario, viene effettuata una prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni, utilizzando, ad esempio, cinque diverse concentrazioni della sostanza chimica in esame: 0,1, 1,0, 10, 100 e 1 000 mg/kg (peso secco di terreno). È sufficiente una replica per ciascun gruppo di trattamento e di controllo.
31. La durata complessiva della prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni è di due settimane. Al termine della prova viene valutata la mortalità degli animali. Un animale è registrato come morto se non presenta alcuna reazione a uno stimolo meccanico all'estremità anteriore. Ulteriori informazioni sulla mortalità possono essere utili per decidere l'ordine di grandezza delle concentrazioni da utilizzare nella prova vera e propria. Devono inoltre essere registrate le modifiche comportamentali negli esemplari adulti (ad esempio, l'incapacità di infossarsi nel terreno; il fatto di giacere immobili contro la parete di vetro del recipiente di prova), i mutamenti morfologici (ad esempio, la presenza di ferite aperte) oltre alla presenza di progenie. Quest'ultima può essere determinata utilizzando il metodo di colorazione descritto nell'appendice 6.

32. Il valore LC_{50} può essere determinato in modo approssimativo calcolando la media geometrica dei dati sulla mortalità. Nel determinare l'ordine di grandezza delle concentrazioni per la prova vera e propria si presuppone che gli effetti sulla riproduzione siano inferiori a LC_{50} di un fattore che può arrivare fino a 10. Si tratta tuttavia di una relazione empirica che potrebbe non verificarsi in casi particolari. Ulteriori osservazioni effettuate nella prova per determinare le concentrazioni, quali la presenza di progenie, possono aiutare ad affinare ulteriormente la gamma di concentrazioni di prova da utilizzare nella prova propriamente detta.
33. Al fine di determinare in modo accurato il valore LC_{50} si raccomanda di effettuare la prova utilizzando almeno quattro repliche per concentrazione della sostanza chimica in esame e un numero adeguato di concentrazioni per ottenere almeno quattro risultati medi differenti e statisticamente significativi in rapporto a tali concentrazioni. Eventualmente viene utilizzato un numero analogo di concentrazioni e repliche per i gruppi di controllo.

Concezione della prova di riproduzione propriamente detta

34. Sulla base delle raccomandazioni emerse da una prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni (2), si propongono tre diverse articolazioni della prova.
 - Per determinare la NOEC si devono sottoporre a prova almeno cinque concentrazioni in una serie geometrica. Si raccomanda di utilizzare almeno quattro repliche per ciascuna concentrazione di prova oltre a otto controlli. Le concentrazioni devono essere spaziate di un fattore non superiore a 1,8.
 - Per determinare la EC_x (ad esempio, EC_{10} , EC_{50}), occorre sottoporre a prova almeno cinque concentrazioni e tali concentrazioni devono comprendere la EC_x così da consentire di ottenere EC_x per interpolazione e non per estrapolazione. Si raccomanda di effettuare almeno quattro repliche per ciascuna concentrazione di prova e quattro repliche per i controlli. Il fattore di spaziatura può variare, ovvero essere pari o inferiore a 1,8 nella gamma di effetti attesa e superiore a 1,8 a concentrazioni superiori o inferiori.
 - Un approccio combinato consente di determinare sia la NOEC che la EC_x . In questo caso si devono utilizzare otto concentrazioni di trattamento formanti una serie geometrica. Si raccomanda di utilizzare almeno quattro repliche per ciascun trattamento oltre a otto controlli. Le concentrazioni devono essere spaziate di un fattore non superiore a 1,8.
35. Si devono utilizzare dieci animali adulti per recipiente di prova (cfr. paragrafo 23). Il mangime è distribuito nei recipienti di prova all'inizio della prova e successivamente una volta alla settimana (cfr. paragrafo 29) fino al 21° giorno incluso. Il 21° giorno campioni di terreno sono accuratamente ispezionati a mano e gli esemplari adulti viventi sono osservati e contati, registrandone le modifiche comportamentali (ad esempio, l'incapacità di infossarsi nel terreno; il fatto di giacere immobili contro la parete di vetro del recipiente di prova) e i mutamenti morfologici (ad esempio, la presenza di ferite aperte). Tutti gli esemplari adulti sono quindi rimossi dai recipienti e dal terreno di prova. Il terreno di prova contenente eventuali bozzoli che sono stati prodotti è mantenuto nell'incubatrice per tre ulteriori settimane nelle stesse condizioni di prova, fatta eccezione per il fatto che l'alimentazione è somministrata soltanto il 35° giorno (25 mg di fiocchi di avena macinati per contenitore).
36. Dopo sei settimane si procede alla conta dei nuovi esemplari nati. Si raccomanda di utilizzare il metodo basato sulla colorazione rosso Bengala (cfr. appendice 6), per quanto si siano mostrate affidabili (4)(10)(11)(20) anche altre tecniche di estrazione in umido (ma non a caldo) e di flottazione (cfr. appendice 6). La colorazione rosso bengala è raccomandata in quanto l'estrazione in umido da un terreno può essere ostacolata dalla torbidità causata dalle particelle di argilla in sospensione.

Prova limite

37. Se nella prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni non si osserva alcun effetto alla concentrazione più alta (ovvero 1 000 mg/kg), la prova di riproduzione può essere effettuata come prova limite utilizzando 1 000 mg/kg al fine di dimostrare che la NOEC per la riproduzione è superiore a questo valore.

Sintesi e calendario per la prova

38. Le fasi della prova possono essere sintetizzate come segue:

Calendario	Prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni	Prova propriamente detta
Giorno -7 o precedente	— Preparazione del terreno artificiale (miscela dei componenti secchi)	— Preparazione del terreno artificiale (miscela dei componenti secchi)
Giorno -5	— Verifica del pH del terreno artificiale — Misurazione della capacità massima di ritenzione idrica (WHC) del terreno	— Verifica del pH del terreno artificiale — Misurazione della capacità massima di ritenzione idrica (WHC) del terreno
Giorno da -5 a -3	— Selezione degli animali per l'acclimatazione	— Selezione degli animali per l'acclimatazione
Giorno da -3 a 0	— Acclimatazione degli animali per almeno 24 ore	— Acclimatazione degli animali per almeno 24 ore
Giorno -1	— Preumidificazione artificiale del suolo e sua ripartizione in lotti	— Preumidificazione artificiale del suolo e sua ripartizione in lotti
Giorno 0	— Preparazione delle soluzioni madre — Applicazione della sostanza chimica in esame — Pesatura del terreno di prova nei recipienti di prova — Aggiunta del mangime — Aggiunta degli animali — Misurazione del pH e del tenore di umidità del suolo	— Preparazione delle soluzioni madre — Applicazione della sostanza chimica in esame — Pesatura del terreno di prova nei recipienti di prova — Aggiunta del mangime — Aggiunta degli animali — Misurazione del pH e del tenore di umidità del suolo
Giorno 7	— Misurazione del tenore di umidità del suolo	— Misurazione del tenore di umidità del suolo — Alimentazione
Giorno 14	— Determinazione della mortalità degli esemplari adulti — Stima della consistenza della progenie — Misurazione del pH e del tenore di umidità del suolo	— Misurazione del tenore di umidità del suolo — Alimentazione
Giorno 21		— Osservazione del comportamento degli adulti — Rimozione degli esemplari adulti — Determinazione della mortalità degli esemplari adulti — Misurazione del tenore di umidità del suolo — Alimentazione
Giorno 28		— Misurazione del tenore di umidità del suolo — Nessuna alimentazione

Calendario	Prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni	Prova propriamente detta
Giorno 35		<ul style="list-style-type: none"> — Misurazione del tenore di umidità del suolo — Alimentazione
Giorno 42		<ul style="list-style-type: none"> — Conteggio della progenie — Misurazione del pH e del tenore di umidità del suolo

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

39. Il presente metodo di prova non presenta alcun orientamento statistico definito per analizzare i risultati della prova, anche se nell'appendice 7 sono fornite indicazioni generali.
40. Nella prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni il principale risultato è dato dalla mortalità. Devono essere inoltre registrate le modifiche comportamentali negli esemplari adulti (ad esempio, l'incapacità di infossarsi nel terreno; il fatto di giacere immobili contro la parete di vetro del recipiente di prova), i mutamenti morfologici (ad esempio, ferite aperte) oltre alla presenza di progenie. Per determinare la LC₅₀ è opportuno di norma applicare l'analisi Probit (21) o la regressione logistica. Tuttavia, nei casi in cui tale metodo di analisi si riveli inadeguato (ad esempio, se si ottengono meno di tre concentrazioni che provocano una mortalità parziale), possono essere utilizzati metodi alternativi, quali le medie mobili (22), il metodo Spearman-Karber semplificato (23) o l'interpolazione semplice (ad esempio, la media geometrica di LC₀ e LC₁₀₀, calcolata mediante la radice quadrata di LC₀ moltiplicata per LC₁₀₀).
41. Nella prova vera e propria il risultato principale è la fecondità (ovvero, la consistenza della progenie prodotta). Tuttavia, come nella prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni, tutti gli altri indicatori di nocività devono essere registrati nella relazione di prova. Ai fini dell'analisi statistica è necessario calcolare la media aritmetica e la deviazione standard relativa alla riproduzione negli animali sottoposti al trattamento e in quelli di controllo.
42. Se è stata effettuata un'analisi della varianza, la deviazione standard, s, e i gradi di libertà, df, possono essere sostituiti con la stima raggruppata della varianza ottenuta rispettivamente dall'analisi della varianza (ANOVA) e dai suoi gradi di libertà — a condizione che la varianza non dipenda dalla concentrazione. In questo caso si utilizzano varianze uniche per i gruppi di controllo e di trattamento. Tali valori sono calcolati di solito mediante software statistici disponibili in commercio che utilizzano i risultati per recipiente come repliche. Se il raggruppamento dei dati relativi ai gruppi di controllo negativi e ai gruppi di controllo contenenti solventi appare più pertinente rispetto al calcolo dei risultati della prova in relazione a uno dei due gruppi di controllo, è necessario verificare mediante una prova che non vi siano differenze significative (un'indicazione delle prove adeguate figura al paragrafo 45 e all'appendice 7).
43. Ulteriori prove e inferenze statistiche dipendono dal fatto che i valori delle repliche siano o no omogenei e distribuiti in modo normale per quanto attiene alla loro varianza.

Stima della NOEC

44. Deve essere preferita l'applicazione di prove di potenza, verificando che i dati abbiano una distribuzione grosso modo normale sulla base delle informazioni disponibili, ad esempio quelle di altre prove interlaboratorio o di altri dati storici. L'omogeneità della varianza (omoschedasticità) è più determinante. L'esperienza ci insegna che la varianza aumenta spesso di pari passo con la media. In questi casi una trasformazione dei dati potrebbe determinare un'omogeneità della varianza. Tale trasformazione, tuttavia deve essere basata sull'esperienza acquisita con i dati storici piuttosto che sui dati in corso di analisi. In presenza di dati omogenei si deve procedere a prove t multiple, quali il test di Williams ($\alpha = 0,05$, test a una coda) (24)(25) o in alcuni casi il test di Dunnett (26)(27). Va rilevato che, nei casi di repliche diseguali, i valori t della tabella devono essere rettificati come suggerito da Dunnett e Williams. Talvolta, in presenza di una variazione significativa, può accadere che l'aumento/diminuzione dei risultati non abbia carattere regolare. In questo caso è opportuno discostarsi in modo marcato dalla monotonicità del test di Dunnett. Nei casi di deviazione dalla monotonicità della varianza, può essere corretto indagare più da vicino i possibili effetti sulle varianze per decidere se sia possibile applicare

le prove t senza perdere molto in potenza (28). In alternativa possono essere effettuati — e sono in genere preferibili alle prove t per varianze diseguali — una prova U multipla, ad esempio il test U di Bonferroni secondo Holm (29) o, quando i dati evidenziano un'eteroschedasticità ma sono altrimenti coerenti con un rapporto dose-risposta monotonico soggiacente, un'altra prova non parametrica [ad esempio, Jonckheere-Terpstra (30) (31) o Shirley (32) (33)]. (si veda anche lo schema di cui all'appendice 7).

45. Se è stata effettuata una prova limite e sono stati rispettati i prerequisiti delle prove parametriche (normalità, omogeneità), si può utilizzare il test t bilaterale di Student oppure il test U di Mann-Whitney (29).

Stima dell'EC_x

46. Per calcolare qualsiasi valore di EC_x si utilizzano le medie per trattamento per l'analisi di regressione (lineare o non lineare) dopo aver ottenuto un'adeguata funzione dose-risposta. Se la crescita degli animali è considerata una risposta continua, i valori della EC_x possono essere stimati avvalendosi di un'adeguata analisi di regressione (35). Tra le funzioni adeguate per i dati di tipo quantale (mortalità/sopravvivenza e consistenza della progenie prodotta) figurano le funzioni sigmoidee normali, le funzioni logistiche o di Weibull, contenenti due o quattro parametri, alcuni dei quali possono anche modellizzare una risposta ormetica. Se una funzione dose-risposta è stata adeguata mediante un'analisi della regressione lineare, si dove trovare mediante l'analisi della regressione un r² (coefficiente di determinazione) e/o una pendenza significativa prima di stimare la EC_x inserendo un valore corrispondente a x % della media del controllo nell'equazione ottenuta mediante analisi della regressione. I limiti di confidenza del 95 % sono calcolati come indicato da Fieller (citato in Finney (21)) o con altri metodi recenti appropriati.
47. In alternativa la risposta è modellizzata come percentuale o proporzione del parametro del modello che è interpretato come la risposta media del controllo. In altri casi la curva sigmoide normale (logistica, Weibull) può essere spesso adeguata facilmente ai risultati utilizzando la procedura di regressione Probit (21). In questi casi la funzione di ponderazione deve essere adeguata per i risultati metrici, come illustrato da Christensen (36). Tuttavia, se viene constatata un'ormesi, è necessario sostituire l'analisi Probit con una funzione logistica o Weibull a quattro parametri adeguata mediante una procedura di regressione non lineare (37). Qualora sia impossibile adeguare ai dati una funzione appropriata dose-risposta, è possibile utilizzare metodi alternativi per stimare la EC_x e i suoi limiti di confidenza, quali le medie mobili secondo Thompson (22) e il metodo Spearman-Karber semplificato (23).

RELAZIONE SULLA PROVA

48. La relazione sulla prova deve comprendere le informazioni seguenti.

Sostanza chimica in esame:

- natura fisica e, se del caso, proprietà fisico-chimiche (ad esempio, idrosolubilità, tensione di vapore);
- identificazione chimica della sostanza chimica in esame secondo la nomenclatura IUPAC, numero CAS, lotto di fabbricazione, lotto di condizionamento, formula strutturale e purezza;
- data di scadenza del campione.

Specie di prova:

- animali utilizzati per la prova: specie, nome scientifico, provenienza degli organismi e condizioni di allevamento.

Condizioni di prova:

- ingredienti e preparazione del terreno artificiale;
- metodo di applicazione della sostanza chimica in esame;
- descrizione delle condizioni di prova, tra cui temperatura, tenore di umidità, pH, ecc.;
- descrizione completa del disegno e delle procedure di prova.

Risultati della prova:

- mortalità degli esemplari adulti dopo due settimane e consistenza della progenie al termine della prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni;
 - mortalità degli esemplari adulti dopo tre settimane di esposizione e censimento completo della progenie alla fine della prova propriamente detta;
 - eventuali sintomi di tipo fisico o patologico e variazioni comportamentali osservati negli organismi sperimentali;
 - LC₅₀, NOEC e/o EC_x (ad esempio, EC₅₀, EC₁₀) per la riproduzione se alcuni di tali valori sono applicabili con intervalli di confidenza e rappresentazione grafica del modello adeguato utilizzato per il loro calcolo, oltre a tutte le informazioni e osservazioni utili per l'interpretazione dei risultati;
- scostamenti rispetto alle procedure descritte nel presente metodo di prova ed eventi insoliti registrati nel corso della prova.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Römbke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen — Enchytraeen. Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.
- (2) Römbke, J. and Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 pp.
- (3) Westheide, W. and Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, In: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Ed. by Esser, G. and Overdieck, D. pp 497-508. Elsevier, Amsterdam,
- (4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.
- (5) Chapter C.8 of this Annex, Toxicity for Earthworms.
- (6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using Artificial Soil substrate, No. 11268-1. ISO, Geneve.
- (7) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.
- (8) Rundgren, S. and A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnorum* (Vejdovsky 1877). In: Løkke, H. and C.A.M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73-94.
- (9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. *Pedobiologia* 23, 217-232.
- (10) Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246-249.
- (11) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- (12) Didden, W.A.M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37, 2-29.
- (13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen — Prüfungskategorien der Forschung. UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19-24.
- (14) Römbke, J. and Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.
- (15) Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (16) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

- (17) Bell, A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902, 1-13.
- (18) Nielsen, C.O. and Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. *Natura Jutlandica* 8-9, 1-160.
- (19) Bouguenec, V. and Giani, N. (1987). Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et redescription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. Ann. Limnol. 23, 9-22.
- (20) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, *Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke* 32, 300-305.
- (21) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- (22) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. — Charles Griffin & Company Ltd, London.
- (23) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11(7), 714-719; Correction *Environ. Sci. Technol.* 12(1998), 417.
- (24) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, 103-117.
- (25) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, 519-531.
- (26) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Amer. Statist. Ass. J.* 50, 1096-1121.
- (27) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20, 482-491.
- (28) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? *Ecotoxicology* 7: 355-361
- (29) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Statist.* 6, 65-70.
- (30) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, *Biometrika* 41, 133-145.
- (31) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, *Indagationes Math.* 14, 327-333.
- (32) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, *Applied Statistics* 28, 144-151.
- (33) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, *Biometrics* 42, 183-186.
- (34) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). *Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research*. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- (35) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18, 213-221.
- (36) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. *Ecotox, Environ. Safety*. 25, 25-32.

Appendice 1

Definizioni

Ai fini del presente metodo di prova si applicano le seguenti definizioni:

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

EC_x (concentrazione con effetto per effetto x %): la concentrazione che determina un effetto di x % sugli organismi di prova entro un determinato periodo di esposizione in rapporto a un gruppo di controllo. Nella presente prova le concentrazioni con effetto sono espresse come massa della sostanza chimica in esame per massa a secco del terreno sperimentale.

LC₀ (assenza di concentrazione letale): la concentrazione della sostanza chimica in esame che, in un dato periodo di tempo, non provoca la morte di nessuno degli organismi della prova che vi sono esposti. Nella presente prova la LC₀ è espressa come massa della sostanza chimica in esame per massa a secco del terreno di prova.

LC₅₀ (concentrazione letale media): la concentrazione della sostanza chimica in esame che, in un dato periodo di tempo, provoca la morte del 50 % degli organismi di prova che vi sono esposti. Nella presente prova la LC₅₀ è espressa come massa della sostanza chimica in esame per massa a secco del terreno di prova.

LC₁₀₀ (concentrazione letale totale): la concentrazione della sostanza chimica in esame che, in un dato periodo di tempo, provoca la morte del 100 % degli organismi di prova che vi sono esposti. Nella presente prova la LC₁₀₀ è espressa come massa della sostanza chimica in esame per massa a secco del terreno di prova.

LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration* — Concentrazione minima alla quale si osserva un effetto significativo): la concentrazione più bassa della sostanza chimica in esame avente un effetto statisticamente significativo ($p < 0,05$). Nella presente prova la LOEC è espressa come massa della sostanza chimica in esame per massa a secco del terreno di prova. Tutte le concentrazioni di prova superiori alla LOEC devono di norma produrre un effetto statisticamente differente da quello osservato nei gruppi di controllo. Tutti gli scostamenti nella rilevazione della LOEC rispetto a quanto indicato precedentemente devono essere giustificati nella relazione.

NOEC (*No Observed Effect Concentration* — Concentrazione senza effetti osservati) è la concentrazione più elevata della sostanza chimica in esame — immediatamente al di sotto della LOEC — alla quale non è osservato alcun effetto. In questa prova la concentrazione corrispondente alla NOEC non produce effetti statisticamente significativi ($p < 0,05$) entro un determinato periodo di esposizione in confronto a un gruppo di controllo.

Tasso di riproduzione: la consistenza media della progenie prodotta per numero di esemplari adulti nel periodo di prova.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela saggidata seguendo il presente metodo di prova.

Appendice 2

Determinazione della capacità massima di ritenzione idrica

Determinazione della capacità massima di ritenzione idrica del terreno artificiale

Il metodo illustrato di seguito, e descritto nell'allegato C della norma ISO DIS 11268-2, è considerato appropriato.

Si raccoglie un quantitativo definito (ad esempio, 5 g) del terreno utilizzato per la prova servendosi di un dispositivo adeguato (coclea, ecc.). Si copre il fondo della coclea con un pezzo di carta da filtro e, dopo averla riempita d'acqua, la si mette a bagnomaria su un supporto. La coclea deve poi essere progressivamente immersa finché il livello dell'acqua venga a coprire la parte superiore del terreno e deve essere lasciata in acqua per almeno tre ore. Poiché non tutta l'acqua assorbita dai capillari del suolo può essere ritenuta, il campione di suolo deve essere lasciato a gocciolare per un periodo di due ore, collocando la coclea su un letto di sabbia di quarzo finemente tritata all'interno di un recipiente chiuso (per evitare l'essiccazione). Il campione deve quindi essere pesato ed essiccato fino al raggiungimento di un peso costante a 105 °C. La capacità di ritenzione idrica può quindi essere calcolata come segue:

$$\text{WHC (in \% di massa secca)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

dove:

S = substrato saturo di acqua + massa della coclea + massa del filtro di carta

T = tara (massa della coclea + massa del filtro di carta)

D = massa secca del substrato

RIFERIMENTI:

ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality -Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.

*Appendice 3***Determinazione del PH del terreno**

Il seguente metodo per determinare il pH di un campione di terreno si basa sulla descrizione di cui alla norma ISO 10390 (Soil Quality — Determination of pH).

Un quantitativo definito di terreno è essiccato a temperatura ambiente per almeno 12 ore. Quindi viene preparata una sospensione del terreno (contenente almeno 5 grammi di terreno) pari a cinque volte il volume di quest'ultimo con una soluzione di 1 M di cloruro di potassio (KCl) al grado analitico o con una soluzione di 0,01 M di cloruro di calcio (CaCl_2) al grado analitico. La sospensione è quindi agitata accuratamente per cinque minuti. Dopo essere stata agitata la soluzione è lasciata a decantare per almeno due ore ma per non più di 24 ore. Il pH della fase liquida è quindi misurato utilizzando un pH-metro che deve essere calibrato prima di ogni misurazione utilizzando un'adeguata serie di soluzioni tampone (ad esempio, pH 4,0 e 7,0).

RIFERIMENTI:

ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

Appendice 4

Condizioni di allevamento di *Enchytraeus* sp.

Gli Enchitreidi della specie *Enchytraeus albidus* (così come di altre specie di *Enchytraeus*) possono essere allevati in grandi cassette di plastica (di dimensioni, ad esempio, 30 × 60 × 10 cm) riempite di una miscela 1:1 di terreno artificiale e di terreno da giardino naturale e non contaminato. Il compost è da evitare poiché può contenere sostanze tossiche, quali i metalli pesanti. Prima dell'utilizzo si deve eliminare la fauna indigena dal terreno (ad esempio, surgelandolo). È possibile utilizzare anche un terreno completamente artificiale, tenendo presente che il tasso di riproduzione potrebbe essere inferiore rispetto a quello ottenuto con i substrati misti. Il substrato utilizzato per l'allevamento deve avere un pH di 6,0 ± 0,5.

Gli animali sono tenuti al buio a una temperatura compresa tra 15 e 20 °C ± 2, evitando in ogni caso temperature superiori a 23 °C. Il terreno deve essere mantenuto umido ma non bagnato. Empiricamente si può verificare il tenore di umidità del terreno stringendo leggermente in mano un pugno di terreno: il tenore di umidità è corretto se tra le dita compaiono goccioline d'acqua. La produzione di condizioni anossiche deve essere evitata accertandosi che i coperchi dei recipienti utilizzati per l'allevamento consentano un adeguato scambio gassoso con l'atmosfera. Il terreno deve essere accuratamente rigirato ogni settimana per facilitarne l'aerazione.

Gli animali possono essere alimentati con fiocchi di avena. L'avena deve essere conservata in recipienti ermeticamente chiusi e deve essere sterilizzata in autoclave o riscaldata prima della somministrazione, onde prevenire eventuali infestazioni da acari della farina (ad esempio, *Glyzyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) o acari predatori [ad esempio, *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*]. Dopo il trattamento a caldo l'alimento deve essere macinato in modo da poterlo distribuire con facilità sulla superficie del terreno. Di quando in quando i fiocchi di avena possono essere integrati con l'aggiunta di vitamine, latte e olio di fegato di merluzzo. Altri alimenti adatti sono il lievito per panificazione o il mangime per pesci "Tetramin".

L'alimentazione è somministrata circa due volte alla settimana. Un quantitativo adeguato di fiocchi di avena è distribuito sulla superficie del terreno o adeguatamente mescolato allo stesso quando il terreno è rigirato per facilitarne l'aerazione. Il quantitativo totale di alimenti somministrati dipende dal numero di animali presenti nel terreno. A livello orientativo, è necessario aumentare il quantitativo di alimenti se quelli somministrati sono consumati entro un giorno. Al contrario, se, al momento della seconda somministrazione (una settimana dopo), vi sono residui di alimenti sul terreno, il loro quantitativo deve essere ridotto. Gli alimenti contaminati da funghi devono essere rimossi e sostituiti. Dopo tre mesi gli animali devono essere trasferiti in un terreno di allevamento fresco.

Le condizioni di allevamento sono ritenute soddisfacenti se gli animali: a) non cercano di scappare dal sostrato, b) si spostano rapidamente nel terreno, c) presentano una livrea brillante sulla quale le particelle di terreno non aderiscono d) presentano un colore più o meno biancastro, e) nell'allevamento sono presenti diverse fasce di età e f) si riproducono di continuo.

Appendice 5

Esecuzione della prova con altre specie di *Enchytraeus*

Selezione delle specie

Nella prova possono essere utilizzate specie diverse da *E. albidus* ma la procedura di prova e i criteri di validità devono essere opportunamente adeguati. Poiché sono disponibili molte specie di *Enchytraeus* che possono essere mantenute in laboratorio in modo soddisfacente, il criterio più importante per selezionare una specie diversa da *E. albidus* è la pertinenza ecologica oltre a una sensibilità comparabile. In alcuni casi il fatto di ricorrere a un'altra specie è inevitabile. Ad esempio nei paesi in cui l'*E. albidus* non è presente e non può essere importato (ad esempio per restrizioni imposte dalla quarantena), è necessario utilizzare un'altra specie di *Enchytraeus*.

Esempi di specie alternative adeguate

- *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992): Negli ultimi anni essa è stata spesso utilizzata negli studi ecotossicologici proprio perché semplice da allevare e da sottoporre a prova. Essa presenta tuttavia l'inconveniente delle piccole dimensioni che ne rendono difficoltosa la manipolazione rispetto a *E. albidus*. (soprattutto nelle fasi che precedono l'uso di un metodo di colorazione). *E. crypticus*: poiché questa specie è stata descritta solo negli allevamenti di lombrichi, la sua esistenza in natura non è certa e quindi non se ne conoscono le esigenze ecologiche.
- *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): Questa denominazione comprende con ogni probabilità un gruppo di specie tra loro strettamente collegate che sono difficili da distinguere sul piano morfologico. Il loro utilizzo nelle prove non è consigliato fino a quando gli esemplari utilizzati in una prova non possano essere attribuiti con certezza a una specie. L'*E. buchholzi* si trova di solito nei prati e in siti disturbati quali i lati delle strade.
- *Enchytraeus luxuriosus*: questa specie, originariamente nota come *E. "minutus"*, è stata descritta di recente (1). Essa è stata reperita per la prima volta da U. Graefe (Amburgo) in un prato nei pressi di St. Peter-Ording (Schleswig-Holstein, Germania). *E. luxuriosus* presenta dimensioni pari a circa la metà di quelle dell'*E. albidus* ma comunque superiori a quelle delle altre specie qui esaminate; potrebbe essere una buona alternativa all'*E. albidus*.
- *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen 1963): Questa specie è stata reperita fino ad oggi in suoli minerali in Germania e Spagna, dove è comune ma di solito non molto abbondante. In confronto ad altre piccole specie di questo genere è relativamente facile da identificare. Non si conosce nulla del suo comportamento nelle prove di laboratorio o della sua sensibilità alle sostanze chimiche, ma è risultata, tuttavia, facile da allevare (E. Belotti, comunicazione personale).

Condizioni di allevamento

Tutte le specie di *Enchytraeus* sopramenzionate possono essere allevate nello stesso substrato utilizzato per l'*E. albidus*. Le loro dimensioni più ridotte implicano che i recipienti per l'allevamento possono essere più piccoli e che i quantitativi di cibo (ma non il tipo) devono essere opportunamente adeguati. Il ciclo di vita di queste specie è più breve rispetto a quello dell'*E. albidus* e la somministrazione degli alimenti deve avvenire con maggiore frequenza.

Condizioni di prova

Le condizioni di prova sono generalmente le stesse che si applicano nel caso dell'*E. albidus*, fatta eccezione per quanto segue:

- i recipienti di prova possono (ma non devono necessariamente) essere più piccoli;
- la durata della prova di riproduzione può (ma non deve necessariamente) essere più breve, ovvero quattro anziché sei settimane; la durata della prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni non deve tuttavia subire variazioni;
- viste le dimensioni ridotte della progenie, si raccomanda vivamente di utilizzare per il conteggio il metodo della colorazione;
- il criterio di validità relativo alla “consistenza della progenie per recipiente di prova nel gruppo di controllo” deve essere portato a “50”.

RIFERIMENTI:

- (1) Schmelz, R.M. and Collado, R. (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp.nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). *Carolina* 57, 93-100.

Appendice 6

Descrizione dettagliata delle tecniche di estrazione

Colorazione con rosso Bengala

Questo metodo, sviluppato originariamente nell'ambito dell'ecologia lacustre (1), è stato proposto per la prima volta per il conteggio delle progenie di Enchitreidi nella prova di riproduzione degli Enchitreidi di W. de Coen (Università di Gand, Belgio). Una versione modificata (rosso Bengala mescolato con formaldeide anziché etanolo), indipendente da quella citata, è stata messa a punto dal RIVM (Bilthoven, Paesi Bassi) (2)(3).

Al termine della prova vera e propria (ovvero dopo sei settimane) il terreno presente nel recipiente è trasferito in un contenitore poco profondo. A tal fine si può utilizzare un recipiente Bellaplast o una bacinella per uso fotografico con fondo striato (questo perché le striature limitano il movimento degli animali nel campo di osservazione). Gli esemplari della progenie sono fissati con etanolo (circa 5 ml per replica). I recipienti sono quindi riempiti di acqua (da 1 a 2 centimetri) e vi sono aggiunte alcune gocce (da 200 a 300 µl) di rosso Bengala (soluzione all'1 % in etanolo), o in alternativa una soluzione allo 0,5 % di eosina, e i due componenti sono accuratamente miscelati. Dopo 12 ore gli animali dovrebbero presentare un colorito rossastro e dovrebbero essere facili da contare in quanto giaceranno sulla superficie del substrato. In alternativa la miscela substrato/alcool può essere filtrata con un setaccio (dimensione delle maglie: 0,250 mm) prima di procedere al conteggio degli animali. Utilizzando questa procedura, la caolinite, la torba e parte della sabbia sono eliminate attraverso il setaccio e gli animali colorati rosso sono più facili da reperire e contare. Anche l'utilizzo di lenti illuminate (lenti di dimensioni pari ad almeno 100 × 75 mm con un fattore di ingrandimento compreso tra 2 e 3×) può facilitare il conteggio.

La tecnica di colorazione riduce i tempi necessari per il conteggio di alcuni minuti per recipiente e, di norma, dovrebbe consentire a una persona di valutare tutti i recipienti di una prova in un massimo di due giorni.

Estrazione in umido

L'estrazione in umido deve essere praticata immediatamente dopo il termine della prova. Il terreno di ciascun recipiente di prova è versato in setacci di plastica con una dimensione delle maglie di circa 1 mm. I setacci sono quindi sospesi in ciotole di plastica senza che ne tocchino il fondo. Le ciotole sono accuratamente riempite di acqua finché i campioni nei setacci sono completamente immersi nell'acqua. Per garantire un tasso di recupero di più del 90 % degli animali presenti, il periodo di estrazione deve durare tre giorni e avvenire a una temperatura di 20 ± 2 ° C. Al termine del periodo di estrazione i setacci sono rimossi e l'acqua (ad eccezione di un piccolo quantitativo) è lasciata a decantare lentamente, avendo cura di non smuovere il sedimento sul fondo delle ciotole. Le ciotole di plastica sono quindi agitate leggermente per sospendere il sedimento nell'acqua sovrastante. L'acqua è quindi trasferita in una capsula Petri e, dopo che le particelle di terreno si sono depositate, gli Enchitreidi possono essere individuati, rimossi e contati utilizzando un microscopio stereoscopico e pinze morbide di acciaio.

Flottazione

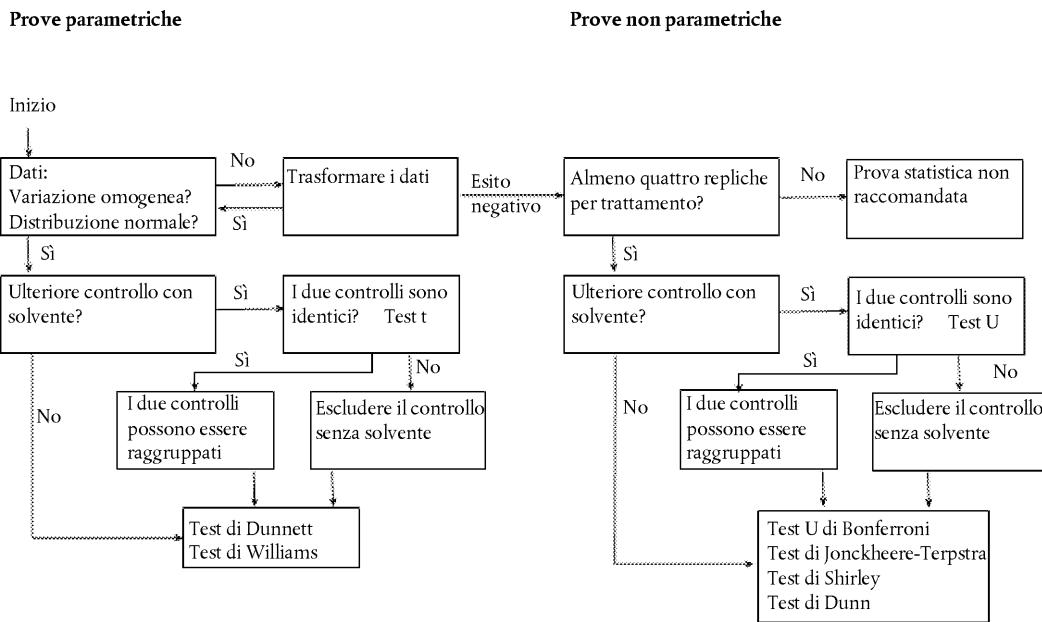
Un metodo basato sulla flottazione è stato descritto in una nota di R. Kuperman (4). Dopo aver fissato con etanolo il contenuto di un recipiente di prova, il terreno è cosparso con Ludox (silice colloidale AM-30, sospensione acquosa al 30 %) fino a un'altezza di 10-15 mm sopra la superficie del terreno. Dopo aver accuratamente mescolato il terreno con l'agente di flottazione per 2-3 minuti, la progenie galleggiante sulla superficie può essere agevolmente contata.

RIFERIMENTI:

- (1) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, *Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke* 32, 300-305.
- (2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.

-
- (3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. and Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. Ecotox. Envir. Safety 38, 108-121.
 - (4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. and Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, p. 157.
-

Appendice 7

Tabella riassuntiva della valutazione statistica dei dati (determinazione della NOEC)

C.33. PROVA DI RIPRODUZIONE PER I LOMBRICHI (*EISENIA FETIDA*/ *EISENIA ANDREI*)**INTRODUZIONE**

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 222 (2004). Esso è finalizzato a valutare gli effetti di sostanze chimiche sulla riproduzione (e su altri endpoint subletali) delle specie di lombrico *Eisenia fetida* (Savigny 1826) o *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1)(2). Il metodo è stato sottoposto a una prova interlaboratorio (3). Esiste già un metodo di prova per saggiare la tossicità acuta sui lombrichi (4). Sono stati pubblicati diversi orientamenti internazionali e nazionali per le prove di tossicità acuta e cronica sui lombrichi (5)(6)(7)(8).
2. Le specie *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* sono considerate rappresentative della fauna del suolo e dei lombrichi in particolare. Informazioni di tipo ecologico sui lombrichi e sul loro impiego nelle prove ecotossicologiche figurano nei riferimenti (7)(9)(10)(11)(12).

PRINCIPIO DELLA PROVA

3. I lombrichi adulti sono esposti a un intervallo di concentrazioni della sostanza chimica in esame, sia miscelata nel terreno, sia, nel caso dei pesticidi, applicata nel o sul suolo utilizzando procedure coerenti con il tipo di uso previsto della sostanza chimica. Il metodo di applicazione è specifico per le finalità della prova. L'intervallo di concentrazioni di prova è selezionato in modo da includervi sia gli effetti subletali sia quelli letali su un periodo di otto settimane. La mortalità e gli effetti sulla crescita in relazione ai lombrichi adulti sono determinati dopo 4 settimane di esposizione. Gli esemplari adulti sono quindi rimossi dal terreno e gli effetti sulla riproduzione sono quindi valutati dopo ulteriori quattro settimane contando la progenie presente nel suolo. Il tasso di riproduzione dei lombrichi esposti alla sostanza chimica in esame è confrontato con il o i gruppi di controllo per determinare i) la concentrazione senza effetti osservati (NOEC) e/o ii) EC_x (ad esempio, EC₁₀, EC₅₀) utilizzando un modello di regressione per stimare la concentrazione che causerebbe una riduzione percentuale x del tasso di riproduzione. Le concentrazioni di prova devono comprendere la EC_x (e.g. EC₁₀, EC₅₀) in modo che la EC_x sia ottenuta per interpolazione anziché per estrapolazione (cfr. l'appendice 1 per le definizioni).

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA CHIMICA IN ESAME

4. Per facilitare la definizione delle adeguate procedure di prova, devono essere disponibili le seguenti informazioni sulla sostanza chimica in esame:
 - idrosolubilità;
 - log K_{ow};
 - tensione di vapore;
 - informazioni sul destino della sostanza e sul suo comportamento nell'ambiente, laddove possibile (ad esempio, tasso di fotolisi e di idrolisi se pertinenti per il tipo di uso previsto).
5. Il presente metodo di prova è applicabile a tutte le sostanze chimiche a prescindere dalla loro idrosolubilità. Il metodo di prova non è applicabile alle sostanze chimiche volatili, definite in questa sede le sostanze chimiche per le quali la costante di Henry o il coefficiente di ripartizione aria/acqua sono maggiori di uno o le sostanze chimiche con tensione di vapore superiore a 0,0133 Pa a 25 °C.
6. Nel presente metodo di prova non si tiene conto della possibile degradazione della sostanza chimica in esame durante il periodo della prova. Di conseguenza non si può partire dal presupposto che le concentrazioni di esposizione saranno mantenute ai valori iniziali per tutta la prova. In questo caso si raccomanda di procedere a un'analisi chimica della sostanza chimica in esame all'inizio e alla fine della prova.

SOSTANZA DI RIFERIMENTO

7. La NOEC e/o la EC_x di una sostanza chimica di riferimento devono essere determinate per assicurare che le condizioni di prova in laboratorio siano adeguate e per verificare che la risposta degli organismi di prova non cambi a livello statistico nel corso del tempo. È consigliabile sottoporre a prova una sostanza chimica di riferimento almeno una volta all'anno o, se ciò avviene con cadenza superiore, in parallelo alla determinazione della tossicità della sostanza chimica in esame. Il carbendazim o il benomil sono sostanze chimiche di riferimento adeguate con effetti dimostrati sulla riproduzione (3). Effetti apprezzabili dovrebbero comparire tra a) 1 e 5 mg di sostanza attiva per kg di massa secca o b) 250-500 g/ha o 25-50 mg/m². Se nella serie di prove è incluso uno standard di tossicità positivo, viene utilizzata una sola concentrazione e il numero delle repliche deve essere uguale a quello dei gruppi di controllo.

VALIDITÀ DELLA PROVA

8. Affinché i risultati della prova possano essere considerati validi, nei gruppi di controllo devono essere soddisfatti i seguenti criteri:
- ciascuna replica (contenente 10 esemplari adulti) deve produrre una progenie di ≥ 30 esemplari entro la fine della prova;
 - il coefficiente di variazione della riproduzione deve essere ≤ 30 %;
 - la mortalità adulta nelle quattro settimane iniziali della prova deve essere ≤ 10 %.

Una prova che non soddisfi i criteri suesposti non deve essere proseguita, a meno che non sia possibile giustificare una sua continuazione. La giustificazione va allegata alla relazione.

DESCRIZIONE DELLA PROVA**Apparecchiatura**

9. Per la prova devono essere utilizzati recipienti in vetro o in altro materiale chimicamente inerte di capacità compresa tra uno e due litri. I recipienti devono presentare una sezione trasversale di circa 200 cm² in modo che la profondità del substrato umido sia di circa 5-6 cm quando vengono aggiunti da 500 a 600 g di massa secca di substrato. Il coperchio del recipiente deve essere progettato in modo tale da consentire lo scambio gassoso tra il substrato e l'atmosfera e l'accesso alla luce (ad esempio, un coperchio trasparente e perforato) evitando tuttavia che i lombrichi possano fuggire. Se il quantitativo di substrato utilizzato per la prova è notevolmente superiore a 500-600 g per recipiente di prova, si deve aumentare di conseguenza anche il numero dei lombrichi.
10. L'esperimento richiede un'apparecchiatura normale di laboratorio, nello specifico:
- una camera di essiccazione;
 - un microscopio stereoscopico;
 - un pH-metro e un fotometro;
 - bilance di precisione adeguata;
 - attrezature adeguate per il controllo della temperatura;
 - attrezture adeguate per il controllo dell'umidità (non essenziali se i recipienti per l'esposizione sono muniti di coperchi);
 - un'incubatrice o stanzetta con aria condizionata;
 - pinzette, ami o anse;
 - bagnomaria.

Preparazione del terreno artificiale

11. In questa prova è utilizzato un terreno artificiale (5)(7) che presenta la seguente composizione (sulla base del peso a secco, con essiccazione fino al raggiungimento di un peso costante a 105 °C):
- 10 % di torba di sfagno (con pH più vicino possibile a 5,5-6,0, priva di residui visibili di piante, finemente macinata ed essiccata fino al raggiungimento di un tenore di umidità misurato);
 - 20 % di argilla caolinica (tenore di caolini preferenza superiore al 30 %);

- tra lo 0,3 e l'1,0 % di carbonato di calcio (CaCO_3 , polverizzato, al grado analitico) per ottenere un pH iniziale di $6,0 \pm 0,5$;
- 70 % di sabbia di quarzo essiccata all'aria (in funzione del quantitativo di CaCO_3 necessario), in prevalenza sabbia fine con più del 50 % delle particelle di dimensioni comprese tra 50 e 200 micron.

Nota 1: Il quantitativo di CaCO_3 necessario dipende dai componenti del terreno, inclusi gli alimenti, e deve essere determinato mediante misurazioni di sottocampioni di terreno immediatamente prima della prova. Il pH è misurato in un campione misto in una soluzione di 1 M di cloruro di potassio (KCl) o 0,01 M di cloruro di calcio (CaCl_2) (13).

Nota 2: Il tenore di carbonio organico del terreno artificiale può essere ridotto, diminuendo, ad esempio, il tenore di torba al 4-5 % e aumentando proporzionalmente il tenore di sabbia. Con una tale riduzione del tenore di carbonio organico, possono diminuire le possibilità di assorbimento della sostanza chimica in esame nel terreno (carbonio organico) e aumentare la disponibilità della sostanza chimica in esame per i vermi. È stato dimostrato che l'*Eisenia fetida* può soddisfare i criteri di validità relativi alla riproduzione quando sottoposta a prova in terreni naturali con un tenore più basso di carbonio organico, ad esempio 2,7 % (14), ed è stato sperimentalmente constatato che ciò vale anche con un terreno artificiale contenente il 5 % di torba. Pertanto, prima di utilizzare un terreno nella prova vera e propria non è necessario dimostrare l'adeguatezza del terreno artificiale per garantire la conformità della prova ai criteri di validità, a meno che il tenore di torba sia ridotto in proporzione maggiore a quanto sopra specificato.

Nota 3: Quando si utilizza terreno naturale in ulteriori prove (ad esempio, sperimentazioni di livello più elevato), è necessario dimostrare inoltre l'adeguatezza del terreno e il rispetto dei criteri di validità della prova.

12. I componenti secchi del terreno sono accuratamente mescolati (ad esempio in un grande miscelatore da laboratorio) in una zona ben ventilata. Prima dell'inizio della prova, il terreno artificiale secco è umidificato aggiungendo acqua deionizzata in quantità sufficiente a ottenere circa la metà del tenore di acqua finale, ovvero tra il 40 % e il 60 % della capacità massima di ritenzione idrica (equivalente al $50 \pm 10\%$ di umidità per massa secca). In questo modo si produce un substrato che, quando compresso nella mano, non presenta acqua residua o stagnante. La capacità massima di ritenzione idrica (WHC) del terreno artificiale è determinata in base alle procedure illustrate nell'appendice 2, alla norma ISO 11274 (15) o a una norma UE equivalente.
13. Se la sostanza chimica in esame è applicata sulla superficie del terreno o miscelata allo stesso senza acqua, il quantitativo finale di acqua può essere miscelato al terreno artificiale durante la preparazione dello stesso. Se la sostanza chimica in esame è miscelata nel terreno utilizzando un po' d'acqua, la restante acqua può essere aggiunta insieme alla sostanza chimica in esame (cfr. paragrafo 19).
14. Il tenore di umidità viene misurato all'inizio e alla fine della prova in conformità alla norma ISO 11465 (16) o a una norma UE equivalente e il pH del terreno in conformità all'appendice 3 o alla norma ISO 10390 (13) o a una norma UE equivalente. Tali misurazioni sono effettuate utilizzando un campione del terreno di controllo e un campione di terreno per ciascuna concentrazione della sostanza chimica in esame. Non è necessario adeguare il pH del terreno quando si sottopongono a prova sostanze chimiche acide o basiche. Il tenore di umidità deve essere monitorato per tutta la durata della prova pesando periodicamente i recipienti (cfr. paragrafi 26 e 30).

Selezione e preparazione degli animali per la prova

15. Nella prova sono utilizzate le specie *Eisenia fetida* o *Eisenia andrei* (1)(2). Per iniziare la prova sono necessari lombrichi adulti con clitello di età compresa tra due mesi e un anno. I lombrichi devono essere selezionati da una coltura di allevamento sincronizzata ed essere compresi in una fascia di età relativamente omogenea (appendice 4). I singoli esemplari di un gruppo di prova non devono avere tra di loro una differenza di età superiore a quattro settimane.
16. I lombrichi selezionati devono essere acclimatati per almeno un giorno nel tipo di terreno artificiale utilizzato per la prova. Durante questo periodo i lombrichi devono essere alimentati con lo stesso mangime che sarà loro somministrato nel corso della prova (cfr. paragrafi da 31 a 33).
17. I lombrichi sono pesati individualmente e ripartiti a caso, per gruppi di 10, nei recipienti di prova all'inizio della stessa. Prima della prova i lombrichi sono lavati (con acqua deionizzata) e l'acqua in eccesso è rimossa deponendo i lombrichi per un istante su una carta filtro. La massa umida dei singoli lombrichi deve essere compresa tra 250 e 600 mg.

Preparazione delle concentrazioni di prova

18. Per l'applicazione della sostanza chimica in esame possono essere usati due metodi: si miscela la sostanza chimica in esame nel terreno (cfr. paragrafi 19-21) o la si applica sulla superficie del terreno (cfr. i paragrafi 22-24). La scelta del metodo adeguato dipende dalle finalità della prova. In generale si raccomanda di miscelare nel suolo la sostanza chimica in esame. Tuttavia, talvolta possono essere necessarie procedure di applicazione conformi alle normali prassi agricole (ad esempio, nebulizzazione di una formulazione liquida o utilizzo di formulazioni speciali di pesticidi, quali granuli o prodotti di trattamento delle sementi). I solventi utilizzati per facilitare il trattamento del terreno con la sostanza chimica in esame devono essere selezionati sulla base della loro bassa tossicità per i lombrichi e nell'articolazione della prova deve essere previsto un adeguato controllo dei solventi (cfr. paragrafo 27).

Miscelazione nel suolo della sostanza chimica in esame

Sostanza chimica in esame solubile in acqua

19. Immediatamente prima di iniziare la prova viene preparata una soluzione della sostanza chimica in esame in acqua deionizzata in quantità sufficiente per tutte le repliche di una concentrazione. Per facilitare la preparazione della soluzione di prova può essere necessario l'uso di un cosolvente. È opportuno preparare la soluzione nella quantità necessaria a raggiungere il tenore di umidità richiesto (tra il 40 % e il 60 % della capacità massima di ritenzione idrica). La soluzione è accuratamente miscelata con il terreno prima di essere versata nel recipiente di prova.

Sostanza chimica in esame insolubile in acqua

20. La sostanza chimica in esame è disciolta in un piccolo volume di un adeguato solvente organico (ad esempio, acetone) e quindi nebulizzata su un piccolo quantitativo di sabbia di quarzo fine o miscelata alla stessa. Il solvente è quindi eliminato per evaporazione sotto una cappa chimica per almeno alcuni minuti. La sabbia così trattata è quindi accuratamente miscelata al terreno artificiale preumidificato. Viene quindi aggiunta, e mescolata al terreno, acqua deionizzata (nel quantitativo richiesto) per conseguire il tenore di umidità finale, ovvero tra il 40 % e il 60 % della capacità massima di ritenzione idrica. Il terreno è quindi pronto per essere versato nei recipienti di prova. È necessario tenere presente che alcuni solventi possono essere tossici per i lombrichi.

Sostanza chimica in esame insolubile in acqua e nei solventi organici

21. Viene preparata una miscela di 10 g di quarzo industriale finemente macinata e del quantitativo della sostanza chimica in esame necessario per conseguire la concentrazione di prova nel terreno. La miscela così ottenuta è quindi accuratamente miscelata al terreno artificiale preumidificato. Viene quindi aggiunta, e mescolata al terreno, acqua deionizzata nel quantitativo richiesto per conseguire il tenore di umidità finale, ovvero tra il 40 % e il 60 % della capacità massima di ritenzione idrica. Il terreno è quindi pronto per essere versato nei recipienti di prova.

Applicazione della sostanza chimica in esame sulla superficie del terreno

22. Il terreno è trattato dopo l'aggiunta dei lombrichi. I recipienti di prova sono prima riempiti con il terreno umidificato, quindi i lombrichi vi sono depositati sulla superficie dopo essere stati pesati. Poiché i lombrichi sani di norma si infossano subito nel terreno, quelli che rimangono in superficie dopo 15 minuti devono essere rimossi in quanto "danneggiati". In caso di sostituzione dei lombrichi, sia quelli nuovi sia quelli rimossi devono essere pesati in modo da conoscere all'inizio il peso vivo totale del gruppo di lombrichi esposti e il peso totale del recipiente contenente i lombrichi.
23. Quindi viene applicata la sostanza chimica in esame, ma non prima che sia trascorsa una mezzora dall'introduzione dei lombrichi (o se vi sono lombrichi sulla superficie) per evitare qualsiasi esposizione diretta per via cutanea alla sostanza chimica in esame. Quando la sostanza chimica in esame è un pesticida può essere opportuno applicarla al terreno per nebulizzazione. La sostanza chimica in esame deve essere applicata sulla superficie del terreno quanto più uniformemente possibile, utilizzando un adeguato nebulizzatore da laboratorio per simulare la nebulizzazione in campo aperto. Prima dell'applicazione della sostanza è necessario rimuovere il coperchio del recipiente, sostituendolo con un rivestimento per proteggere le pareti laterali del recipiente. Il rivestimento può essere un recipiente di prova dal quale è stata rimossa la base. L'applicazione deve avvenire a una temperatura compresa tra $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e, nel caso delle soluzioni acquose, delle emulsioni o delle dispersioni a un tasso compreso tra 600 e 800 $\mu\text{l}/\text{m}^2$. Il tasso deve essere verificato utilizzando un'adeguata tecnica di taratura. Le formulazioni speciali, quali granuli o prodotti di trattamento delle sementi, devono essere applicate in modo conforme alle prassi agricole.

24. I recipienti di prova non devono essere coperti per un periodo di un'ora per consentire l'evaporazione degli eventuali solventi volatili associati all'applicazione della sostanza chimica in esame. Durante questo periodo si deve vigilare affinché nessun lombrico esca dai recipienti di prova.

PROCEDURA

Gruppi di prova e di controllo

25. Si raccomanda di ripartire 10 lombrichi per 500-600 g di massa secca di terreno artificiale (ovvero, 50-60 g di terreno per lombrico). Qualora siano usati quantitativi superiori di terreno, come può avvenire nel caso delle prove di pesticidi con modalità particolari di applicazione, ad esempio i prodotti di trattamento delle sementi, il carico di 50-60 g di terreno per lombrico deve essere mantenuto aumentando il numero di lombrichi nei recipienti. Per ciascun recipiente di trattamento e di controllo sono preparati dieci lombrichi. I lombrichi sono lavati con acqua, asciugati e quindi lasciati per un po' su un foglio di carta assorbente per smaltire l'eccesso di acqua.
26. Per evitare errori sistematici nella distribuzione dei lombrichi nei recipienti di prova, è necessario determinare l'omogeneità della popolazione utilizzata pesando individualmente 20 esemplari scelti a caso tra quelli destinati ad essere utilizzati nella prova. Una volta stabilita tale omogeneità, i lotti di lombrichi devono essere selezionati, pesati e destinati ai recipienti di prova utilizzando protocolli di randomizzazione. Dopo l'aggiunta dei lombrichi si deve pesare ciascun recipiente di prova per acquisire un peso iniziale da utilizzare come base per il monitoraggio del tenore di umidità del terreno nel corso della prova, come descritto al paragrafo 30. I recipienti di prova sono quindi coperti, come illustrato al paragrafo 9, e collocati nella camera utilizzata per la prova.
27. Per ciascuno dei metodi di prova per l'applicazione della sostanza chimica, di cui ai paragrafi da 18 a 24, sono predisposti adeguati gruppi di controllo. Per la preparazione dei gruppi di controllo si seguono tutte le pertinenti procedure sopradescritte, ad eccezione del fatto che non viene aggiunta la sostanza chimica in esame. Quindi, se del caso, i solventi organici, la sabbia di quarzo o altri mezzi disperdenti sono utilizzati nei gruppi di controllo in concentrazioni/quantitativi conformi a quelli usati nei gruppi di trattamento. Se la sostanza chimica in esame è applicata con l'ausilio di un solvente o altro mezzo disperdente, è necessario predisporre un altro gruppo di controllo in cui non sono usati il mezzo disperdente o la sostanza chimica in esame al fine di assicurarsi che il mezzo disperdente non influenzi i risultati.

Condizioni di prova

28. La prova si svolge a una temperatura di 20 ± 2 °C e sulla base di un fotoperiodo controllato di luce/buio (di preferenza 16 ore di luce e 8 ore di buio) con un'intensità luminosa compresa tra 400 e 800 lx nella zona dei recipienti di prova.
29. I recipienti non sono aerati durante la prova ma devono disporre di coperchi progettati in modo tale da consentire lo scambio gassoso, limitando al contempo l'evaporazione dell'umidità (cfr. paragrafo 9).
30. Per mantenere durante tutta la durata della prova il tenore di acqua del terreno dei recipienti di prova, questi ultimi (ad eccezione dei coperchi) sono ripesati periodicamente. Le perdite sono compensate con l'aggiunta di acqua deionizzata. Il tenore di acqua non deve variare di più del 10 % rispetto al valore che aveva all'inizio della prova.

Alimentazione

31. Ai fini della prova è considerato accettabile qualsiasi alimento avente proprietà dimostrate tali da garantire, quantomeno, che i lombrichi mantengano il loro peso durante la prova. L'esperienza ha dimostrato che la farina di avena e lo stallatico equino o bovino costituiscono alimenti adeguati. Si deve tuttavia verificare che gli equini o i bovini di cui si intendono utilizzare le deiezioni non siano sottoposti a trattamento veterinario con sostanze chimiche quali fattori di crescita, nematicidi o prodotti veterinari analoghi che potrebbero risultare nocivi per i lombrichi nel corso della prova. Si raccomanda di procedere in proprio alla raccolta dello stallatico bovino, in quanto l'esperienza ha dimostrato che quello disponibile in commercio, e utilizzato come fertilizzante da giardino, può avere effetti nocivi sui lombrichi. Prima dell'uso lo stallatico deve essere essiccato all'aria, finemente tritato e pastorizzato.
32. Prima dell'utilizzo nella prova ciascun nuovo lotto di alimenti viene somministrato a un allevamento di lombrichi non sottoposti a prova per accertarsi che sia di qualità adeguata. La crescita e la produzione di bozzoli non deve evidenziare una riduzione rispetto a quanto avviene per i lombrichi allevati in un terreno al quale non è stato aggiunto il nuovo lotto di alimenti (le condizioni sono illustrate nel metodo di prova C.8.(4)).

33. Gli alimenti sono somministrati un giorno dopo laggiunta dei lombrichi e lapplicazione sul terreno della sostanza chimica in esame. Circa 5 g di alimento sono distribuiti sulla superficie del terreno di ciascun recipiente di prova e inumiditi con acqua deionizzata (circa 5-6 ml per recipiente). Successivamente gli alimenti sono somministrati una volta alla settimana nelle 4 settimane di durata della prova. Se non tutti gli alimenti vengono consumati, è necessario diminuire la razione per evitare la formazione di funghi o muffa. Gli esemplari adulti sono rimossi dal terreno il ventottesimo giorno della prova e ulteriori 5 g di alimenti sono distribuiti in ciascun recipiente di prova. Nelle restanti quattro settimane della prova non vengono somministrati altri alimenti.

Selezione delle concentrazioni di prova

34. Le informazioni disponibili sulla tossicità della sostanza chimica in esame, ad esempio risultati di prove di tossicità acuta (4) e/o di studi di definizione dellintervallo di concentrazione, dovrebbero essere di aiuto nella scelta delle concentrazioni di prova appropriate. Se necessario, viene effettuata una prova di determinazione dellintervallo delle concentrazioni, utilizzando, ad esempio, cinque diverse concentrazioni della sostanza chimica in esame: 0,1, 1,0, 10, 100 e 1 000 mg/kg (massa secca di terreno). È sufficiente una replica per ciascun gruppo di trattamento e di controllo. La prova di determinazione dellintervallo delle concentrazioni dura due settimane, al termine delle quali viene valutata la mortalità.

Disegno sperimentale

35. Poiché per la prova non è possibile indicare un'unica statistica riepilogativa, il presente metodo fornisce indicazioni per determinare la NOEC e l EC_x . È probabile che in un futuro prossimo le autorità di regolamentazione richiedano la NOEC, come pure che, a breve termine, si generalizzi luso dell EC_x per ragioni di ordine ecologico e statistico. Pertanto, sulla base delle raccomandazioni emerse da una prova interlaboratorio di riproduzione degli enchitreidi (17), si propongono tre diverse articolazioni della prova.

36. Nel fissare lintervallo delle concentrazioni si deve tenere presente quanto segue:

- Per determinare la NOEC si devono sottoporre a prova almeno cinque/dodici concentrazioni in una serie geometrica. Si raccomanda di utilizzare almeno quattro repliche per ciascuna concentrazione di prova oltre a otto controlli. Le concentrazioni devono essere spaziate di un fattore non superiore a 2,0.
- Per determinare l EC_x (ad esempio, EC_{10} , EC_{50}) si raccomanda luso di un numero adeguato di concentrazioni per ottenere almeno quattro risultati medi differenti e statisticamente significativi in rapporto a tali concentrazioni. Si raccomanda di effettuare almeno due repliche per ciascuna concentrazione di prova e sei repliche per i controlli. Il fattore di distanza può variare, ovvero essere pari o inferiore a 1,8 nellintervallo di effetti attesi e superiore a 1,8 a concentrazioni superiori o inferiori.
- Un approccio combinato consente di determinare sia la NOEC che l EC_x . In questo caso si devono utilizzare otto concentrazioni di trattamento formanti una serie geometrica. Si raccomanda di utilizzare almeno quattro repliche per ciascun trattamento oltre a otto controlli. Le concentrazioni devono essere distanziate di un fattore non superiore a 1,8.

Durata della prova e misurazioni

37. Il 28° giorno gli esemplari adulti viventi sono osservati e contati. Devono essere inoltre registrate le anomalie comportamentali (ad esempio, lincapacità di infossarsi nel terreno; il fatto di giacere immobili) e i mutamenti morfologici (ad esempio, la presenza di ferite aperte). Tutti gli esemplari adulti sono quindi rimossi dai recipienti di prova, contati e pesati. Il trasferimento del terreno contenente i lombrichi su un vassoio pulito prima della valutazione può facilitare la ricerca degli esemplari adulti. I lombrichi estratti dal suolo sono lavati (con acqua deionizzata) prima di essere pesati e lacqua in eccesso è rimossa deponendo i lombrichi per un istante su una carta filtro. Tutti i lombrichi che non sono reperiti in questa fase sono registrati come morti, in quanto si suppone che siano morti e si siano decomposti prima della valutazione.
38. Il terreno rimosso dai recipienti (privo dei lombrichi adulti ma contenete gli eventuali bozzoli prodotti) deve esservi reintrodotto. Il terreno è quindi mantenuto in incubatrice per altre quattro settimane nelle stesse condizioni di prova, ad eccezione del fatto che gli alimenti sono somministrati soltanto una volta allinizio di tale fase della prova (cfr. paragrafo 33).

39. Al termine del secondo periodo di quattro settimane si determina, utilizzando le procedure di cui all'appendice 5, la consistenza della progenie nata dai bozzoli e il numero di quest'ultimi. Durante la durata della prova è necessario inoltre registrare tutte le indicazioni di lesioni o effetti nocivi riscontrati sui lombrichi.

Prova limite

40. Se nella prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni non si osserva alcun effetto alla concentrazione più alta (ovvero 1 000 mg/kg), la prova di riproduzione viene effettuata come prova limite utilizzando una concentrazione di prova pari a 1 000 mg/kg. Una prova limite fornisce l'opportunità di dimostrare che la NOEC per la riproduzione è superiore alla concentrazione limite, riducendo al contempo il numero di lombrichi utilizzati nella prova. Sia per il terreno di prova sia per quello di controllo devono essere usate otto repliche.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

41. Il presente metodo di prova non presenta alcun orientamento statistico definito per analizzare i risultati della prova, anche se nell'appendice 6 sono fornite indicazioni generali.
42. Un risultato significativo è costituito dalla mortalità. Devono essere inoltre registrate le modifiche comportamentali negli esemplari adulti (ad esempio, l'incapacità di infossarsi nel terreno; il fatto di giacere immobili contro la parete di vetro del recipiente di prova), i mutamenti morfologici (ad esempio, ferite aperte) oltre alla presenza di progenie. Per determinare la LC₅₀ è opportuno di norma applicare l'analisi Probit (18) o la regressione logistica. Tuttavia, nei casi in cui tale metodo di analisi si riveli inadeguato (ad esempio, se si ottengono meno di tre concentrazioni che provocano una mortalità parziale), possono essere utilizzati metodi alternativi, quali le medie mobili (19), il metodo Spearman-Karber semplificato (20) o l'interpolazione semplice (ad esempio, la media geometrica di LC₀ e LC₁₀₀, calcolata mediante la radice quadrata di LC₀ moltiplicata per LC₁₀₀).
43. L'altro risultato significativo è la fecondità (ovvero, la consistenza della progenie prodotta). Tuttavia, come nella prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni, tutti gli altri indicatori di nocività devono essere registrati nella relazione di prova. Ai fini dell'analisi statistica è necessario calcolare la media aritmetica \bar{x} e la deviazione standard relativa alla riproduzione negli animali sottoposti al trattamento e in quelli di controllo.
44. Se è stata effettuata un'analisi della varianza, la deviazione standard, s, e i gradi di libertà (df) possono essere sostituiti con la stima raggruppata della varianza ottenuta rispettivamente dall'analisi della varianza (ANOVA) e dai suoi gradi di libertà — a condizione che la varianza non dipenda dalla concentrazione. In questo caso si utilizzano varianze uniche per i gruppi di controllo e di trattamento. Tali valori sono calcolati di solito mediante software statistici disponibili in commercio che utilizzano i risultati per recipiente come repliche. Se il raggruppamento dei dati relativi ai controlli negativi e ai controlli contenenti solventi appare più pertinente rispetto al fatto di calcolare i risultati della prova in relazione a uno dei due controlli, è necessario verificare mediante una prova che non emergano differenze significative (per le prove adeguate si vedano il paragrafo 47 e l'appendice 6).
45. Ulteriori prove e inferenze statistiche dipendono dal fatto che i valori delle repliche siano o no omogenei e distribuiti in modo normale per quanto attiene alla loro varianza.

Stima della NOEC

46. Deve essere preferita l'applicazione di prove di potenza, verificando che i dati abbiano una distribuzione grosso modo normale sulla base delle informazioni disponibili, ad esempio quelle di altre prove interlaboratorio o di altri dati storici. L'omogeneità della varianza (omoschedasticità) è più determinante. L'esperienza ci insegna che la varianza aumenta spesso di pari passo con la media. In questi casi una trasformazione dei dati potrebbe determinare l'omoschedasticità. Tale trasformazione, tuttavia deve essere basata sull'esperienza acquisita con i dati storici piuttosto che sui dati in corso di analisi. In presenza di dati omogenei si deve procedere a prove t multiple, quali il test di Williams ($\alpha = 0,05$, test a una coda) (21)(22) o in alcuni casi il test di Dunnett (23)(24). Va rilevato che, nei casi di repliche diseguali, i valori t della tabella devono essere rettificati come suggerito da Dunnett e Williams. Talvolta, in presenza di una variazione significativa, può accadere che l'aumento/diminuzione delle risposte non abbia carattere regolare. In questo caso è opportuno discostarsi in modo marcato dalla monotonicità del test di Dunnett. Nei casi di deviazione dall'omoschedasticità, può essere corretto indagare più da vicino i possibili effetti sulle varianze per decidere se sia possibile applicare le prove t

senza perdere molto in potenza (25). In alternativa possono essere effettuati — e sono in genere preferibili alle prove t per varianze diseguali — una prova U multipla, ad esempio il test U di Bonferroni secondo Holm (26) o, quando i dati evidenziano un'eteroschedasticità ma sono altrimenti coerenti con un rapporto dose-risposta monotono soggiacente, un'altra prova non parametrica (ad esempio, Jonckheere-Terpstra (27) (28) o Shirley (29) (30)). (si veda anche lo schema di cui all'appendice 6).

47. Se è stata effettuata una prova limite e sono state rispettati i prerequisiti delle prove parametriche (normalità, omogeneità), si può utilizzare il test t bilaterale di Student oppure il test U di Mann-Whitney (31).

Stima dell' EC_x

48. Per calcolare qualsiasi valore di EC_x si utilizzano le medie per trattamento per l'analisi di regressione (lineare o non lineare) dopo aver ottenuto un'adeguata funzione dose-risposta. Se la crescita degli animali è considerata una risposta continua, i valori della EC_x possono essere stimati avvalendosi di un'adeguata analisi di regressione (32). Tra le funzioni adeguate per i dati di tipo quantale (mortalità/sopravvivenza) e consistenza della progenie prodotta figurano le funzioni sigmoidi normali, le funzioni logistiche o di Weibull, contenenti due o quattro parametri, alcuni dei quali possono anche modellizzare una risposta ormetica. Se una funzione dose-risposta è stata adeguata mediante un'analisi della regressione lineare, si dove trovare mediante l'analisi della regressione un r^2 (coefficiente di determinazione) e/o una pendenza significativa prima di stimare la EC_x inserendo un valore corrispondente a x % della media del controllo nell'equazione ottenuta mediante analisi della regressione. I limiti di confidenza del 95 % sono calcolati come indicato da Fieller (citato in Finney (18)) o con altri metodi recenti appropriati.
49. In alternativa la risposta è modellizzata come percentuale o proporzione del parametro del modello che è interpretato come la risposta media del controllo. In altri casi la curva sigmoide normale (logistica, Weibull) può essere spesso adeguata facilmente ai risultati utilizzando la procedura di regressione probit (18). In questi casi la funzione di ponderazione deve essere adeguata per i risultati metrici, come illustrato da Christensen (33). Tuttavia, se viene constatata un'ormesi, è necessario sostituire l'analisi Probit con una funzione logistica o Weibull a quattro parametri adeguata mediante una procedura di regressione non lineare (34). Qualora sia impossibile adeguare ai dati una funzione appropriata dose-risposta, è possibile utilizzare metodi alternativi per stimare la EC_x e i suoi limiti di confidenza, quali le medie mobili secondo Thompson (19) e il metodo Spearman-Karber semplificato (20).

RELAZIONE SULLA PROVA

50. La relazione sulla prova deve comprendere le informazioni seguenti.

Sostanza chimica in esame:

- descrizione completa della sostanza chimica in esame, partita, lotto, numero CAS, purezza;
- proprietà della sostanza chimica in esame (ad esempio, log Kow, idrosolubilità, tensione di vapore, costante di Henry (H) e informazioni sul destino e sul comportamento).

Organismi di prova

- animali utilizzati per la prova: specie, nome scientifico, provenienza degli organismi e condizioni di allevamento;
- età, intervallo delle dimensioni (massa) degli organismi di prova.

Condizioni di prova

- informazioni sulla preparazione del terreno per la prova;
- capacità massima di ritenzione idrica del terreno;
- descrizione delle tecniche utilizzate per applicare sul terreno la sostanza chimica in esame;
- informazioni sugli ausiliari chimici utilizzati per la somministrazione della sostanza chimica in esame;
- se del caso, informazioni sulla calibratura dei dispositivi di nebulizzazione;
- descrizione del disegno e delle procedure sperimentali;
- dimensioni dei recipienti di prova e volume del terreno di prova;
- condizioni della prova: intensità luminosa, durata dei fotoperiodi luce/buio, temperatura;

- descrizione del regime alimentare, tipo e quantitativi degli alimenti utilizzati nella prova, date di somministrazione degli alimenti;
- pH e tenore di acqua del terreno all'inizio e alla fine della prova.

Risultati della prova:

- mortalità tra gli esemplari adulti (%) in ciascun recipiente di prova al termine delle 4 settimane di prova;
 - massa totale degli esemplari adulti all'inizio della prova in ciascun recipiente di prova;
 - variazioni di peso degli esemplari adulti vivi (in % del peso iniziale) in ciascun recipiente di prova dopo le prime quattro settimane di prova;
 - consistenza della progenie prodotta in ciascun recipiente di prova al termine della stessa;
 - descrizione degli effetti evidenti o dei sintomi patologici o di cambiamenti distinti di comportamento;
 - risultati ottenuti con la sostanza chimica di riferimento;
 - LC₅₀, NOEC e/o EC_x (ad esempio, EC₅₀, EC₁₀) per la riproduzione, se alcuni di tali valori sono applicabili con intervalli di confidenza e rappresentazione grafica del modello adeguato utilizzato per il loro calcolo oltre a tutte le informazioni e osservazioni utili per l'interpretazione dei risultati.
 - la curva della relazione dose-risposta;
 - i risultati applicabili a ciascun contenitore di prova;
- scostamenti rispetto alle procedure descritte nel presente metodo di prova ed eventi insoliti registrati nel corso della prova.

BIBLIOGRAFIA

- (1) aenicke, J. (1982). "Eisenia foetida" is two biological species. *Megadrilogica* 4, 6-8.
- (2) Oien, N. and J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm — III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. *Comp. Biochem. Physiol.* 78c (2), 277 — 282.
- (3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida/Eisenia andrei* — comparison of two ringtests. In: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. *Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtsch.* Berlin-Dahlem, 320, p. 50-82.
- (4) Chapter C.8 of this Annex, Earthworm acute toxicity test.
- (5) ISO (International Organization for Standardization) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.
- (6) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Geneve.
- (7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., and L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 pp.
- (8) EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, April 1996.
- (9) Bouché, M.B. (1972). Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.
- (10) Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.
- (11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

- (12) Edwards, C.A. and J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3rd Edition. Chapman and Hall, London.
- (13) (ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.
- (14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (15) ISO (International Organization for Standardization) (1992). Soil Quality —Determination of water retention characteristics —Laboratory methods, No. 11274. ISO, Geneve.
- (16) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality —Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.
- (17) Römbke, J. and Th. Moser (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150+ 223 pp.
- (18) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- (19) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. — Charles Griffin & Company Ltd, London.
- (20) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.
- (21) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.
- (22) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.
- (23) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.
- (24) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.
- (25) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361
- (26) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.
- (27) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.
- (28) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.
- (29) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.
- (30) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.
- (31) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- (32) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494
- (33) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.
- (34) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

Appendice 1

Definizioni

Al presente metodo di prova si applicano le seguenti definizioni:

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

EC_x (concentrazione con effetto per effetto x %): la concentrazione che determina un effetto di x % sugli organismi sperimentali entro un determinato periodo di esposizione in confronto a un gruppo di controllo. Ad esempio, EC₅₀ è una concentrazione che si stima provochi un effetto determinato sul 50 % di una popolazione esposta durante un periodo definito di esposizione. Nella presente prova le concentrazioni con effetto sono espresse come massa della sostanza chimica in esame per massa a secco del terreno di prova o come massa della sostanza chimica in esame per unità di superficie del terreno.

LC₀ (assenza di concentrazione letale): la concentrazione della sostanza chimica in esame che, in un dato periodo di tempo, non provoca la morte di nessuno degli organismi della prova che vi sono esposti. Nella presente prova la LC₀ è espressa come massa della sostanza chimica in esame per massa a secco del terreno di prova.

LC₅₀ (concentrazione letale media): la concentrazione della sostanza chimica in esame che, in un dato periodo di tempo, provoca la morte del 50 % degli organismi della prova che vi sono esposti. Nella presente prova l'LC₅₀ espressa come massa della sostanza chimica in esame per massa a secco del terreno di prova o come massa della sostanza chimica in esame per unità di superficie del terreno.

LC₁₀₀ (concentrazione letale totale): la concentrazione della sostanza chimica in esame che, in un dato periodo di tempo, provoca la morte del 100 % degli organismi di prova che vi sono esposti. Nella presente prova la LC₁₀₀ è espressa come massa della sostanza chimica in esame per massa a secco del terreno di prova.

LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration* — Concentrazione minima alla quale si osserva un effetto significativo): la concentrazione più bassa della sostanza chimica in esame avente un effetto statisticamente significativo ($p < 0,05$). Nella presente prova la LOEC espressa come massa della sostanza chimica in esame per massa a secco del terreno di prova o come massa della sostanza chimica in esame per unità di superficie del terreno. Tutte le concentrazioni di prova superiori alla LOEC devono di norma produrre un effetto statisticamente differente da quello osservato nei gruppi di controllo. Tutti gli scostamenti rispetto a quanto indicato precedentemente devono essere giustificati nella relazione.

NOEC (*No Observed Effect Concentration* — Concentrazione senza effetti osservati) è la concentrazione più elevata della sostanza chimica in esame — immediatamente al di sotto della LOEC — alla quale non è osservato alcun effetto. In questa prova la concentrazione corrispondente alla NOEC non produce effetti statisticamente significativi ($p < 0,05$) entro un determinato periodo di esposizione in confronto a un gruppo di controllo.

Tasso di riproduzione: la media del numero della progenie prodotta per un determinato numero di esemplari adulti nel periodo di prova.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela saggidata seguendo il presente metodo di prova.

Appendice 2

Determinazione della capacità massima di ritenzione idrica del terreno

Per determinare la capacità massima di ritenzione idrica del terreno il metodo illustrato di seguito, e descritto nell'allegato C della norma ISO DIS 11268-2 (1), è considerato appropriato.

Si raccoglie un quantitativo definito (ad esempio, 5 g) del terreno utilizzato per la prova servendosi di un dispositivo adeguato (tubo Auger, ecc.). Si copre il fondo del tubo con un pezzo di carta da filtro e, dopo averla riempita d'acqua, la si mette a bagnomaria su un supporto. Il tubo Auger deve poi essere progressivamente immerso finché il livello dell'acqua venga a coprire la parte superiore del terreno e deve essere lasciata in acqua per almeno tre ore. Poiché non tutta l'acqua assorbita dai capillari del suolo può essere ritenuta, il campione di suolo deve essere lasciato a gocciolare per un periodo di due ore, collocando il tubo Auger su un letto di sabbia di quarzo finemente tritata all'interno di un recipiente coperto (per evitare l'essiccazione). Il campione deve quindi essere pesato ed essiccato fino al raggiungimento di un peso costante a 105 °C. La capacità di ritenzione idrica (WHC) può quindi essere calcolata come segue:

$$\text{WHC (in \% di massa secca)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

dove:

S = substrato saturo di acqua + massa del tubo Auger + massa del filtro di carta

T = tara (massa del tubo Auger + massa del filtro di carta)

D = massa secca del substrato

RIFERIMENTI:

- (1) ISO (International Organization for Standardisation) (1996). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

*Appendice 3***Determinazione del PH del terreno**

Il seguente metodo per determinare il pH del terreno si basa sulla descrizione di cui alla norma ISO DIS 10390: Soil Quality — Determination of pH (1).

Un quantitativo definito di terreno è essiccato a temperatura ambiente per almeno 12 ore. Quindi viene preparata una sospensione del terreno (contenente almeno 5 grammi di terreno) pari a cinque volte il volume di quest'ultimo con una soluzione di 1 M di cloruro di potassio (KCl) al grado analitico o con una soluzione di 0,01 M di cloruro di calcio (CaCl_2) al grado analitico. La soluzione è quindi agitata vigorosamente per cinque minuti e quindi lasciata decantare per almeno due ore ma per non più di 24 ore. Il pH della fase liquida è quindi misurato utilizzando un pH-metro che deve essere calibrato prima di ogni misurazione utilizzando un'adeguata serie di soluzioni tampone (ad esempio, pH 4,0 e 7,0).

RIFERIMENTI:

- (1) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.
-

Appendice 4

Allevamento di *Eisenia fetida* /*Eisenia andrei*

È preferibile che l'allevamento sia condotto in una camera climatica a $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, temperatura alla quale, con la somministrazione di alimenti sufficienti, i lombrichi raggiungono la maturità in 2/3 mesi.

Entrambe le specie possono essere allevate in deiezioni animali di vario tipo. Il mezzo di allevamento raccomandato è una miscela di stallatico equino o bovino e torba in parti uguali. Si deve tuttavia verificare che gli equini o i bovini di cui si intendono utilizzare le deiezioni non siano sottoposti a trattamento veterinario con sostanze chimiche quali fattori di crescita, nematicidi o prodotti veterinari analoghi che potrebbero risultare nocivi per i lombrichi nel corso della prova. Si raccomanda di procedere in proprio alla raccolta dello stallatico bovino proveniente da fonte "organica", in quanto l'esperienza ha dimostrato che quello disponibile in commercio, e utilizzato come fertilizzante da giardino, può avere effetti nocivi sui lombrichi. Il mezzo di cui trattasi deve avere un pH di circa 6-7 (adeguato con carbonato di calcio), una conduttività ionica bassa (meno di 6 mg o concentrazione di sali inferiore a 0,5 %) e non essere troppo contaminato da ammoniaca o urina animale. Il substrato deve essere umido ma non troppo bagnato. Le cassette di allevamento più idonee hanno capacità compresa tra 10 e 50 litri.

Per ottenere una popolazione di lombrichi omogenea per età e dimensioni (massa), è consigliabile iniziare l'allevamento con i bozzoli. L'allevamento, una volta creato, viene mantenuto mettendo i lombrichi adulti in una cassetta di allevamento contenente terreno fresco per un periodo compreso tra 14 e 28 giorni per consentire la produzione di ulteriori bozzoli. Gli esemplari adulti sono quindi rimossi e la progenie prodotta dai bozzoli è utilizzata come base per l'allevamento successivo. I lombrichi sono alimentati in permanenza con deiezioni animali e, di quando in quando, sono trasferiti in una cassetta con terreno fresco. L'esperienza ha dimostrato che lo stallatico equino o bovino o la farina di avena costituiscono alimenti adeguati. Si deve tuttavia verificare che gli equini o i bovini di cui si intendono utilizzare le deiezioni non siano sottoposti a trattamento veterinario con sostanze chimiche quali fattori di crescita, che potrebbero risultare nocivi per i lombrichi in un allevamento di lunga durata. I lombrichi nati dai bozzoli sono utilizzati per le prove quando hanno un'età compresa tra 2 o 12 mesi e sono considerati adulti.

I lombrichi delle specie sono considerati in buona salute se si muovono nel substrato, non tentano di fuggire e si riproducono continuamente. Una certa inazione dei lombrichi e una colorazione gialla dell'estremità posteriore sono indice di impoverimento del substrato. In questo caso si raccomanda di aggiungere terreno fresco o di ridurre la densità dell'allevamento.

Appendice 5

Tecniche per il conteggio della progenie nata dai bozzoli

La selezione manuale dei lombrichi dal terreno richiede molto tempo. Si raccomandano, pertanto, due metodi alternativi:

- a) i recipienti di prova sono messi a bagnomaria a una temperatura di 40 °C aumentata poi fino a 60 °C. Dopo circa 20 minuti la progenie dovrebbe apparire sulla superficie del terreno dalla quale può essere facilmente rimossa e contata;
- b) il terreno di prova può essere passato al setaccio utilizzando il metodo messo a punto da van Gestel et al. (1), a condizione che la torba, lo stallatico o la farina di avena aggiunti al terreno siano stati finemente tritati. Due setacci aventi larghezza delle maglie di 0,5 mm (diametro 30 cm) sono collocati l'uno sopra l'altro. Il contenuto del recipiente di prova è passato al setaccio utilizzando un getto potente di acqua del rubinetto. In questo modo, sul setaccio superiore restano principalmente i lombrichi più piccoli e i bozzoli. È importante notare che l'intera superficie del setaccio superiore deve essere mantenuta bagnata durante tutta l'operazione in modo che i lombrichi più piccoli galleggino su uno strato d'acqua e non scappino passando tra le maglie del setaccio. I migliori risultati si ottengono utilizzando il getto di una doccetta.

Una volta passato al setaccio tutto il terreno, il setaccio superiore può essere lavato sopra una ciotola in modo da raccogliere in quest'ultima i lombrichi piccoli e i bozzoli. Si lascia quindi decantare il contenuto della ciotola finché i bozzoli vuoti galleggino in superficie e quelli pieni e i giovani lombrichi si depositino sul fondo. Quindi si svuota la ciotola dall'acqua che vi era rimasta e i piccoli lombrichi e i bozzoli sono trasferiti in una capsula Petri contenente un po' d'acqua, dalla quale i lombrichi possono essere rimossi utilizzando un ago o pinzette.

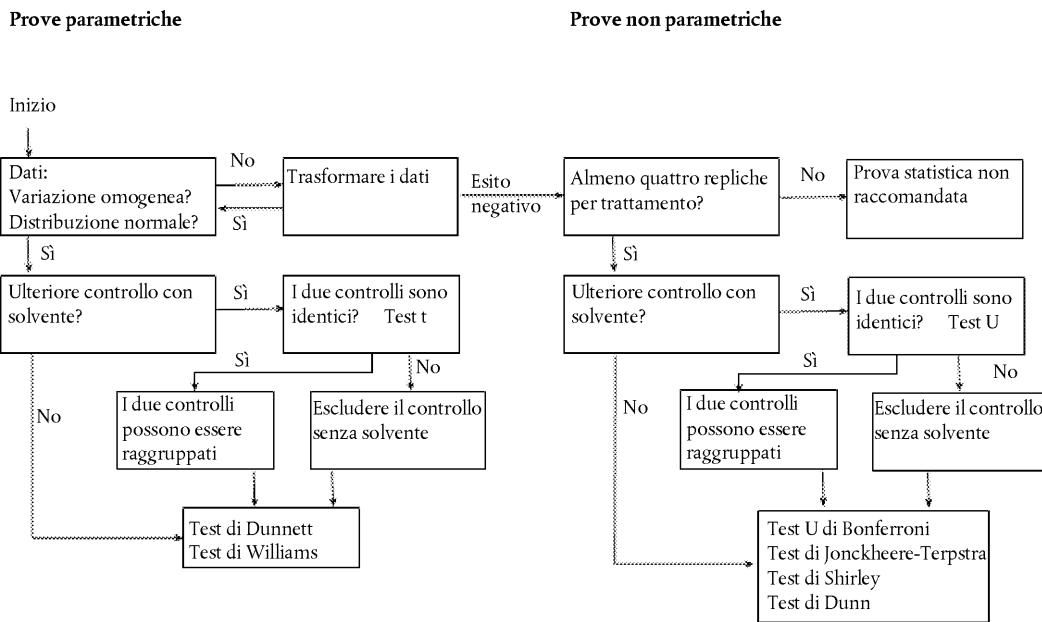
L'esperienza ha dimostrato che il metodo (a) è il più efficace per l'estrazione dei piccoli lombrichi in quanto essi riescono a passare attraverso un setaccio, anche con maglie di 0,5 mm.

Si deve sempre determinare l'efficienza del metodo utilizzato per rimuovere i lombrichi (e, se del caso, i bozzoli) dal terreno. Se la progenie è raccolta utilizzando una tecnica di selezione a mano, è consigliabile ripetere l'operazione due volte su tutti i campioni.

RIFERIMENTI:

- (1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. *Pedobiologia* 32:367-371.

Appendice 6

Tabella riassuntiva della valutazione statistica dei dati (determinazione della NOEC)

C.34. DETERMINAZIONE DELL'INIBIZIONE DELL'ATTIVITÀ DEI BATTERI ANAEROBICI — RIDUZIONE DELLA PRODUZIONE DI GAS DA FANGHI DIGESTORI ANAEROBICI (DELLE ACQUE REFLUE)

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 224 (2007). Le sostanze chimiche scaricate in ambienti acquatici passano sia attraverso zone aerobiche che anaerobiche, nelle quali possono essere degradate e/o dove possono inibire l'attività batterica; in alcuni casi possono rimanere indisturbate in zone anaerobiche per decenni od oltre. Nel trattamento delle acque reflue, la prima fase (sedimentazione primaria) è aerobica nel surnatante e anaerobica nel subnatante dei fanghi. A queste segue nella fase secondaria una zona aerobica nel serbatoio di aerazione dei fanghi attivi e una zona anaerobica nel subnatante dei fanghi nella vasca di sedimentazione secondaria. I fanghi provenienti da entrambe le fasi sono solitamente sottoposti a trattamento anaerobico, che produce metano e biossido di carbonio normalmente utilizzati per la produzione di energia elettrica. In ambienti aperti, le sostanze chimiche che raggiungono i sedimenti nelle baie, negli estuari e nel mare sono suscettibili di restare in queste zone anaerobiche a tempo indeterminato a meno che siano biodegradabili. Alcune proprietà fisiche, quali una scarsa idrosolubilità, un elevato adsorbimento sui solidi in sospensione o un'incapacità di biodegradazione aerobica, permetteranno ad alcune sostanze chimiche di raggiungere tali zone in proporzioni più significative.
2. Sebbene sia auspicabile che le sostanze chimiche scaricate nell'ambiente siano biodegradabili sia in condizioni aerobiche che anaerobiche, è fondamentale che esse non impediscano l'attività dei microrganismi nell'una o nell'altra zona. Nel Regno Unito vi sono stati alcuni casi di inibizione totale della produzione di metano dovuta, per esempio, al pentaclorofenolo contenuto negli scarichi industriali, che hanno comportato il trasporto dei fanghi inibiti, estremamente costoso, dai digestori verso siti "sicuri" e l'importazione di fanghi digestori sani da impianti vicini. Ma vi sono stati molti casi di perturbazioni meno gravi della digestione a causa di diverse altre sostanze chimiche, compresi aloidrocarburi alifatici (lavaggio a secco) e detergenti, che comportano un significativo deterioramento dell'efficienza del digestore.
3. Solo il metodo di prova C.11 (1) si occupa dell'inibizione dell'attività batterica (inibizione della respirazione dei fanghi attivi), valutando l'effetto della sostanza chimica in esame sul tasso di consumo di ossigeno in presenza di substrato. Il metodo è stato ampiamente utilizzato per fornire un'allerta tempestiva circa possibili effetti nocivi delle sostanze chimiche sul trattamento aerobico delle acque reflue, e anche per valutare le concentrazioni non inibitorie delle sostanze chimiche in esame da utilizzare nelle varie prove di biodegradabilità. Il metodo di prova C.43 (2) permette di determinare (anche se limitatamente) la tossicità della sostanza in esame per la produzione di gas da fanghi anaerobici, diluita a un decimo della sua normale concentrazione di solidi per consentire la precisione richiesta nella valutazione della percentuale di biodegradazione. Visto che i fanghi diluiti possono essere più sensibili alle sostanze chimiche inibitorie, il gruppo ISO ha deciso di elaborare un metodo che prevede fanghi non diluiti. Dopo aver esaminato almeno tre documenti (provenienti da Danimarca, Germania e Regno Unito), alla fine sono state compilate due norme ISO: la prima utilizza fanghi non diluiti (ISO 13 641-1 (3)) e l'altra fanghi diluiti cento volte (ISO 13 641-2 (4)), in modo da rappresentare fanghiglia e sedimenti con una bassa presenza di popolazioni batteriche. Entrambi i metodi sono stati sottoposti a una prova interlaboratorio (*ring test*) (5); la prima è stata riconosciuta come norma accettabile, ma non vi è stata unanimità sulla seconda. Il Regno Unito ha ritenuto che il metodo richiedesse un'ulteriore indagine, data la percentuale significativa dei partecipanti che hanno segnalato una produzione di gas molto scarsa o inesistente, in parte perché la percentuale di spazio gassoso era troppo elevata (75 %) per una sensibilità ottimale.
4. Alcuni lavori svolti in precedenza nel Regno Unito (6) (7) avevano descritto un metodo manometrico che ricorreva a fanghi digerenti non diluiti, con l'aggiunta di acque reflue non trattate come substrato, in matracci da 500 ml; l'apparecchiatura era complessa e il cattivo odore proveniente dai fanghi non trattati era sgradevole. In seguito è stata utilizzata con successo da Wilson et al. (10) l'apparecchiatura più compatta e pratica di Shelton e Tiedje (8), sviluppata da Battersby e Wilson (9). Kawahara et al (11) hanno preparato con successo altri fanghi standard in laboratorio da utilizzare nelle prove di biodegradabilità anaerobica e di inibizione su una serie di sostanze chimiche. Inoltre, i fanghi non trattati usati come substrato sono stati sostituiti con fanghi anaerobici diluiti cento volte o con fanghiglia, sedimenti ecc. a bassa attività batterica per un'ulteriore prova.
5. Questo metodo permette di ottenere informazioni utili per prevedere il probabile effetto di una sostanza chimica sulla produzione di gas in digestori anaerobici. Tuttavia, solo prove più estese che simulano più rigorosamente il funzionamento dei digestori sono in grado di indicare se l'adattamento dei microrganismi alla sostanza in esame può avvenire o se agenti chimici che possono essere assorbiti e adsorbiti sui fanghi possono accumularsi fino a giungere a una concentrazione tossica su un periodo più lungo rispetto a quello di questa prova.

PRINCIPIO DELLA PROVA

6. Aliquote di una miscela di fanghi a digestione anaerobica (da 20 g/l a 40 g/l di solidi totali) e una soluzione degradabile di substrato vengono incubate individualmente e in parallelo con la sostanza chimica in esame in quantità comprese in un determinato intervallo di concentrazioni, in recipienti chiusi per tre giorni al massimo. La quantità di gas prodotti (metano più anidride carbonica) è misurata tramite l'aumento della pressione (Pa) nei recipienti. L'inibizione percentuale della produzione di gas risultante dalle diverse concentrazioni della sostanza chimica in esame è calcolata a partire dalle quantità prodotte nei recipienti di prova e di controllo. Il valore EC₅₀ e altre concentrazioni efficaci sono calcolate a partire dalle curve delle percentuali di inibizione in base alla concentrazione delle sostanze chimiche in esame o, più generalmente, al suo logaritmo decimale.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

7. Le sostanze chimiche in esame devono, di norma, essere utilizzate nella forma più pura facilmente disponibile, in quanto le impurità presenti in alcune di esse, ad esempio i clorofenoli, possono essere molto più tossiche delle sostanze stesse. Tuttavia, occorre prendere in considerazione l'opportunità di testare le sostanze chimiche nella forma in cui sono state prodotte/rese commercialmente disponibili. Si sconsiglia di utilizzare regolarmente prodotti formulati, sebbene possa essere necessario ricorrervi in caso di sostanze chimiche scarsamente solubili. Occorre conoscere le seguenti proprietà della sostanza chimica in esame: solubilità in acqua e in alcuni solventi organici, tensione di vapore, coefficiente di adsorbimento, idrolisi e biodegradabilità in condizioni anaerobiche.

APPLICABILITÀ DEL METODO

8. La prova si applica a sostanze chimiche solubili o insolubili in acqua, comprese sostanze chimiche volatili. È indispensabile prendere precauzioni particolari con i materiali caratterizzati da bassa solubilità in acqua (cfr. riferimento (12)) ed elevata volatilità. Si possono inoltre utilizzare inoculi provenienti da altri siti anaerobici, ad esempio fanghiglia, suoli saturi o sedimenti. I sistemi a batteri anaerobici precedentemente esposti a sostanze chimiche tossiche possono essere adattati cosicché mantengano la loro attività anche in presenza di sostanze xenobiotiche. Gli inoculi provenienti da sistemi batterici adattati potrebbero avere una maggiore tolleranza alle sostanze in esame rispetto a quelli provenienti da sistemi non adattati.

SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

9. Per verificare la procedura, occorre svolgere una prova su una sostanza chimica di riferimento predisponendo recipienti adeguati in parallelo come parte delle normali prove sperimentali; il 3,5-diclorofenolo ha dimostrato di essere un inibitore costante della produzione di gas anaerobica, nonché del consumo di ossigeno da parte dei fanghi attivi e di altre reazioni biochimiche. Altre due sostanze chimiche hanno dimostrato di possedere una maggiore capacità inibitoria della produzione di metano rispetto al 3,5-diclorofenolo, vale a dire il metilene bis(tiocianato) e il pentaclorofenolo, ma i risultati di queste sostanze non sono stati convalidati. Il pentaclorofenolo è sconsigliato in quanto non è facilmente disponibile in forma pura.

RIPRODUCIBILITÀ DEI RISULTATI

10. In una prova interlaboratorio internazionale (5) è stata rilevata solo una media riproducibilità tra i valori di EC₅₀ dei 10 laboratori partecipanti, per il 3,5-diclorofenolo e l'acido 2-bromo-etano-sulfonico (l'intervallo per il primo andava da 32 mg/l a 502 mg/l e per il secondo da 220 a 2 190 mg/l).

Numero di laboratori	In mg/l			In mg/g di fanghi		
	media	deviazione standard	coefficiente di variazione	media	deviazione standard	coefficiente di variazione
3,5-triclorofenolo						
10	153	158	103	5	4,6	92
acido 2-bromo-etano-sulfonico						
10	1 058	896	85	34	26	76

Dati EC₅₀ della prova interlaboratorio — fanghi non diluiti

11. Gli alti coefficienti di variazione tra i laboratori riflettono principalmente le differenze di sensibilità dei microorganismi dei fanghi in quanto precedentemente esposti oppure non esposti alla sostanza in esame o ad altre sostanze chimicamente affini. La precisione nella determinazione del valore EC₅₀ sulla base della concentrazione del fango era di poco superiore a quella del valore "volumetrico" (mg/l). Nei tre laboratori che hanno indicato la precisione del loro valore EC₅₀ per il 3,5-diclorofenolo, i coefficienti di variazione erano nettamente inferiori (22, 9 e 18 %, rispettivamente, per il valore EC₅₀ in mg/g) rispetto a quelli della media di tutti e dieci i laboratori. Le medie individuali dei tre laboratori erano, rispettivamente: 3,1, 3,2 e 2,8 mg/g. I coefficienti di variazione più bassi e accettabili all'interno dello stesso laboratorio, rispetto ai coefficienti molto più elevati tra i valori dei diversi laboratori (ossia 9-22 %, cf. 92 %), indicano la presenza di differenze significative nelle proprietà dei singoli fanghi.

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiature

12. Occorre utilizzare normali apparecchiature di laboratorio e quanto indicato di seguito:
- a) incubatore — anti-scintilla e termostatato a 35 °C ± 2 °C;
 - b) recipienti di prova in vetro pressoresistente di capacità nominale ⁽¹⁾ adeguata, muniti di un setto rivestito a tenuta di gas, resistente a una pressione di circa 2 bar o 2×10^5 Pa (per il rivestimento si userà ad esempio del PTFE = politetrafluoroetilene). Si raccomanda di usare bottiglie da siero di volume nominale pari a 125 ml, con un volume effettivo di circa 160 ml, chiuse ermeticamente con setti per siero ⁽²⁾ e chiusure a ghiera in alluminio; è anche possibile usare bottiglie il cui volume totale va da 0,1 a 1 litro;
 - c) manometro di precisione ⁽³⁾ e dispositivo di fissaggio degli aghi
la produzione totale di gas (metano più anidride carbonica) è misurata mediante un manometro in grado di misurare e far sfriatare il gas prodotto, ad esempio un manometro manuale di precisione collegato a un ago da siringa; una valvola a tre vie a tenuta di gas permette di sfriatare la pressione in eccesso (appendice 1). È necessario mantenere il volume interno delle tubature e della valvola del trasduttore di pressione al più basso livello possibile, in modo da contenere al massimo eventuali errori che possono essere introdotti se si trascura il volume delle apparecchiature;
 - d) contenitori isolati, per il trasporto di fanghi digestori;
 - e) valvole a pressione a tre vie;
 - f) setaccio a maglie quadrate di 1 mm;
 - g) serbatoio, per la digestione dei fanghi: un flacone di vetro o di polietilene ad alta densità, con una capacità di circa 5 litri, provvisto di un agitatore e di un dispositivo che consenta il passaggio di una corrente di azoto gassoso (cfr. paragrafo 13) attraverso lo spazio di testa;
 - h) filtri a membrana (0,2 µm) per la sterilizzazione del substrato;

⁽¹⁾ La dimensione raccomandata va da 0,1 a 1 litro.

⁽²⁾ Si raccomanda l'uso di setti in silicone a tenuta di gas. Si raccomanda inoltre di verificare che i tappi siano effettivamente a tenuta di gas, specialmente per quelli con setti in butile, in quanto molti dei setti disponibili in commercio non sono sufficientemente stagni per il metano e alcuni non lo sono più se vengono perforati con un ago come richiesto dal protocollo della prova.

- Per le sostanze chimiche volatili si raccomanda l'uso di setti rivestiti a tenuta di gas (alcuni dei setti disponibili in commercio sono relativamente sottili, meno di 0,5 cm, e non sono più a tenuta stagna per il gas una volta perforati con un ago da siringa).
- Se le sostanze in esame non sono volatili si raccomandano setti in gomma di butile (circa 1 cm) perché, di norma, continuano ad essere a tenuta stagna per il gas anche dopo essere stati perforati.
- Prima della prova, si raccomanda di controllare i setti con attenzione per verificare che continuino a essere a tenuta di gas anche dopo essere stati perforati.

⁽³⁾ Il manometro di precisione deve essere utilizzato e tarato a intervalli regolari, seguendo le istruzioni del fabbricante. Se si utilizza un manometro della qualità prescritta (per es. incapsulato con una membrana di acciaio), non è necessario tararlo in laboratorio. La taratura va effettuata in un istituto abilitato agli intervalli raccomandati. L'accuratezza della taratura può essere verificata in laboratorio, con una misurazione puntuale a 1×10^5 Pa rispetto a un manometro ad indicatore analogico. Una misurazione corretta di questo punto garantisce che anche la linearità non venga alterata. Se vengono utilizzati altri dispositivi di misurazione (senza taratura certificata dal fabbricante), si raccomanda di procedere a una conversione sull'intervallo totale, a intervalli regolari (cfr. allegato 2).

- i) microsiringhe, per la connessione a tenuta di gas del trasduttore di pressione (cfr. paragrafo 12 (c)) allo spazio di testa nelle bottiglie (vedere paragrafo 12 (b)); le microsiringhe servono anche ad aggiungere sostanze di prova liquide insolubili nelle bottiglie;
- j) scatola a guanti (*glove box*), facoltativa ma consigliata, con una leggera pressione positiva di azoto.

Reagenti

13. Utilizzare sempre reagenti di grado analitico. Utilizzare sempre gas di azoto di elevata purezza con tenore di ossigeno inferiore a 5 µl/l.

Acqua

14. Se, in qualsiasi fase, è necessario ricorrere a diluizione, utilizzare acqua deionizzata precedentemente deaerata. Non è necessario procedere a controlli analitici su quest'acqua, ma occorre garantire che l'apparecchiatura per la deionizzazione sia sottoposta a manutenzione periodica. Utilizzare acqua deionizzata anche per la preparazione delle soluzioni madre. Verificare che le soluzioni o le diluizioni della sostanza chimica in esame siano prive di ossigeno prima di aggiungere l'inoculo anaerobico. Per procedere alla verifica, gorgogliare gas di azoto attraverso l'acqua di diluizione (o attraverso le diluizioni) per 1 ora prima di aggiungere l'inoculo, oppure, in alternativa, riscaldare l'acqua di diluizione fino al punto di ebollizione e lasciare raffreddare a temperatura ambiente in un'atmosfera priva di ossigeno.

Fanghi digeriti

15. Raccogliere i fanghi digestori attivi prelevandoli da un digestore in un impianto di trattamento delle acque reflue, oppure da un digestore da laboratorio che tratti principalmente fanghi da liquami domestici. Altrove (11) sono disponibili informazioni pratiche sui fanghi provenienti da digestori da laboratorio. Se si intende fare uso di un inoculo adattato, occorre eventualmente prevedere di prelevare fanghi digestori da un impianto di trattamento delle acque reflue industriali. Per raccogliere i fanghi utilizzare bottiglie a collo ampio in polietilene ad alta densità o materiali analoghi, che possono espandersi. Aggiungere i fanghi alle bottiglie riempiendole fino a 1 cm dal tappo, sigillare ermeticamente, preferibilmente con una valvola di sicurezza (cfr. paragrafo 12 (e)) e riporre in contenitori isolati (paragrafo 12 (d)) per limitare quanto più possibile gli shock termici finché i fanghi vengono trasferiti in un incubatore a temperatura costante di 35 °C ± 2 °C. All'apertura delle bottiglie, fare attenzione a rilasciare il gas in eccesso aprendo con precauzione il tappo oppure utilizzando la valvola a pressione a tre vie (paragrafo 12 (e)). Se possibile utilizzare i fanghi entro poche ore dalla raccolta, oppure conservarli a 35 °C ± 2 °C sotto uno spazio di testa riempito di azoto per un massimo di tre giorni in modo da incidere limitatamente sull'attività.

Avvertenza: i fanghi digestori producono gas infiammabili che comportano rischi di incendio e di esplosione e contengono inoltre organismi potenzialmente patogeni. Si raccomanda quindi di adottare precauzioni adeguate al momento di manipolarli. Per motivi di sicurezza, non utilizzare recipienti di vetro per la raccolta dei fanghi.

Inoculo

16. Immediatamente prima dell'uso, mescolare i fanghi tramite leggera agitazione e passarli a un setaccio con maglie di 1 mm² (paragrafo 12 (f)) raccogliendoli in una bottiglia idonea (paragrafo 12 (g)) attraverso il cui spazio di testa viene fatta passare una corrente di azoto. Accantonare un campione per misurare la concentrazione del quantitativo totale di solidi secchi (cfr. ad esempio ISO 11 923 (13) o norme UE equivalenti). In generale, utilizzare i fanghi senza diluizione. La concentrazione dei solidi si situa solitamente tra il 2 e il 4 % (p/v). Controllare il valore del pH dei fanghi e, se necessario, correggerlo a pH 7 ± 0,5.

Substrato per la prova

17. Sciogliere 10 g di brodo nutriente (es. Oxoid), 10 g di estratto di lievito e 10 g di D-glucosio in acqua deionizzata e portare a 100 ml. Sterilizzare filtrando attraverso una membrana con porosità di 0,2 µm (paragrafo 12 (h)) e usare immediatamente o conservare a 4 °C per non più di 1 giorno.

Sostanza chimica in esame

18. Preparare una soluzione madre separata per ogni sostanza chimica idrosolubile in esame che contenga, ad esempio, 10 g/l della sostanza in acqua di diluizione priva di ossigeno (paragrafo 14). Utilizzare la quantità corretta di queste soluzioni madre per preparare le miscele di reazione in concentrazioni crescenti. In alternativa, è possibile preparare una serie di diluizioni di ogni soluzione madre in modo da aggiungere un volume identico in ciascuna bottiglia di prova per ciascuna concentrazione finale richiesta. Il pH della soluzione madre deve essere corretto a 7 ± 0,2, se necessario.

19. Per le sostanze chimiche non sufficientemente solubili in acqua, consultare la norma ISO 10 634 (12) o la norma UE equivalente. Se è necessario utilizzare un solvente organico, evitare quelli come il cloroformio e il tetrachloruro di carbonio, in quanto ne è nota la forte capacità inibitoria della produzione di metano. Preparare, in un solvente volatile adeguato, per esempio acetone o dietiletere, una soluzione a concentrazione adeguata di sostanze chimiche insolubili nell'acqua. Aggiungere il volume necessario di soluzione di solvente nelle bottiglie di prova vuote (paragrafo 12 (b)) e far evaporare il solvente prima di aggiungere i fanghi. Per altri trattamenti, ricorrere alla norma ISO 10 634 (12) o a una norma UE equivalente, tenendo però conto del fatto che i tensioattivi utilizzati per produrre emulsioni possono inibire la produzione anaerobica di gas. Se si ritiene che la presenza di solventi organici e agenti emulsionanti possa causare artefatti, la sostanza chimica può essere aggiunta direttamente alla miscela di prova sotto forma di polvere o di liquido. Le sostanze chimiche volatili e le sostanze chimiche in esame liquide e insolubili in acqua possono essere iniettate nelle bottiglie di siero inoculato utilizzando microsiringhe (paragrafo 12 (i)).
20. Aggiungere le sostanze chimiche in esame alle bottiglie per ottenere una serie geometrica di concentrazioni, ad esempio 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l e 15,6 mg/l. Se non è possibile prevedere l'intervallo di tossicità sulla base di sostanze simili, occorre svolgere una prova preliminare per determinare l'intervallo di tossicità appropriato su concentrazioni di 1 000 mg/l, 100 mg/l e 10 mg/l.

Sostanza chimica di riferimento

21. Preparare una soluzione acquosa di 3,5-diclorofenolo (10 g/l) aggiungendo gradualmente al solido la quantità minima di 5 mol/l di soluzione di idrossido di sodio, agitando nel contempo fino a scioglierlo. Aggiungere quindi acqua di diluizione deossigenata (paragrafo 14) al volume richiesto; la sonicazione può facilitare lo scioglimento. È possibile utilizzare altre sostanze chimiche di riferimento se l'intervallo medio del valore di EC₅₀ è stato ottenuto in almeno tre prove con inoculi diversi (fonti diverse o tempi di raccolta diversi).

INTERFERENZA/ERRORI

22. Alcuni componenti dei fanghi potrebbero presumibilmente reagire con potenziali inibitori rendendoli indisponibili per i microrganismi e dando luogo a un'inibizione ridotta o nulla. Inoltre, se i fanghi contengono già una sostanza chimica che esercita un effetto inibitore, si otterrebbero risultati erronei sottoponendo a prova tale sostanza chimica. Oltre a quelli appena citati, vi sono altri fattori che possono generare falsi risultati; sono elencati nell'appendice 3, insieme ai metodi per eliminare o perlomeno ridurre gli errori.

PROCEDURA SPERIMENTALE

23. Il numero necessario di repliche dipende dal grado di precisione richiesto per gli indici di inibizione. Se i sigilli delle bottiglie sono sufficientemente a tenuta di gas per tutta la durata della prova, preparare un solo lotto (almeno tre repliche) di bottiglie di prova per ciascuna concentrazione richiesta. Analogamente, allestire un lotto di bottiglie contenenti la sostanza chimica di riferimento e una serie di controlli. Tuttavia, se i sigilli delle bottiglie sono affidabili solo se perforati una o poche volte, preparare un lotto (per, ad esempio, tre repliche) delle bottiglie di prova per ciascun intervallo (t) per il quale sono richiesti dei risultati per tutte le concentrazioni di una sostanza chimica sottoposta a prova. Analogamente, allestire dei lotti "t" di bottiglie per la sostanza chimica di riferimento e per i controlli.
24. È raccomandato l'uso di una scatola a guanti (paragrafo 12 (j)). Almeno 30 minuti prima dell'inizio della prova avviare un flusso di gas di azoto nella scatola a guanti contenente tutte le necessarie apparecchiature. Verificare che la temperatura dei fanghi si mantenga tra 35 °C ± 2 °C quando si manipolano e sigillano le bottiglie.

Prova preliminare

25. Se l'attività dei fanghi è sconosciuta, si raccomanda di effettuare una prova preliminare. Predisporre dei controlli che indichino, ad esempio, le concentrazioni di solidi a 10 g/l, 20 g/l e 40 g/l più il substrato, ma senza utilizzare la sostanza chimica in esame. Inoltre, utilizzare volumi diversi della miscela di reazione al fine di disporre di tre o quattro valori diversi del rapporto tra il volume dello spazio di testa e il volume del liquido. Tra i risultati dei volumi di gas prodotti a vari intervalli di tempo, si sceglieranno le condizioni più appropriate ad ottenere due misurazioni giornaliere caratterizzate da volumi significativi di gas e da un rilascio giornaliero di pressione con sensibilità ottimale (⁽¹⁾) senza timore di esplosione.

⁽¹⁾ Ciò si applica al modello sperimentale e alle condizioni sperimentali nelle quali i volumi di gas prodotti (dai controlli in bianco e dai recipienti indicanti un'inibizione del 70-80 %) possono essere stimati con margini di errore accettabili.

Aggiunta delle sostanze chimiche in esame

26. Aggiungere le sostanze chimiche idrosolubili in esame alle bottiglie di prova vuote (paragrafo 12 (b)) sotto forma di soluzioni acquose (paragrafo 18). Utilizzare lotti di bottiglie composti come minimo da triplicati di ciascuna concentrazione dell'intervallo (paragrafo 20). Nel caso di sostanze chimiche scarsamente solubili e insolubili, iniettare le loro soluzioni in solventi organici in bottiglie vuote con una microsiringa, fino a ottenere dei lotti di repliche per ognuna delle cinque concentrazioni della sostanza chimica in esame. Far evaporare il solvente facendo passare un getto di gas di azoto sulla superficie delle soluzioni nelle bottiglie di prova. In alternativa, è possibile aggiungere quantità pesate delle sostanze chimiche insolubili solide direttamente nelle bottiglie di prova.
27. Se le sostanze chimiche in esame liquide insolubili e scarsamente solubili nell'acqua non vengono aggiunte utilizzando un solvente, è possibile introdurle direttamente tramite microsiringa nelle bottiglie dopo l'aggiunta dell'inoculo e del substrato di prova (cfr. paragrafo 30). Anche le sostanze chimiche volatili in esame possono essere aggiunte in questo modo.

Aggiunta dell'inoculo e del substrato

28. Agitare un volume adeguato di fanghi digestori setacciati (cfr. paragrafo 16) in una bottiglia da 5 litri (paragrafo 12 (g)), facendo passare un flusso di gas di azoto nello spazio di testa. Bonificare le bottiglie di prova, contenenti le soluzioni acquose o le soluzioni in un solvente evaporato delle sostanze chimiche in esame, per circa due minuti con un flusso di gas di azoto per rimuovere l'aria. Ripartire le aliquote, ad esempio 100 ml, di fanghi ben mescolati nelle bottiglie di prova utilizzando una pipetta con puntale a foro largo o una provetta graduata. È essenziale riempire la pipetta in una volta sola con l'esatto volume di fanghi necessario, in quanto le materie solide dei fanghi sedimentano con facilità. Se il volume è eccessivo, svuotare la pipetta e ricominciare.
29. Mentre si continua a bonificare con l'azoto, procedere ad aggiungere una quantità sufficiente di soluzione di substrato (paragrafo 17) in modo da ottenere nella miscela una concentrazione di 2 g/l di ciascuna delle sostanze nutritive seguenti: brodo nutriente, estratto di lievito e D-glucosio. La tabella che segue riporta un esempio per lotti di prova.

Concentrazione finale in massa della sostanza chimica in esame nelle bottiglie di prova (mg/l)	Volume della sostanza chimica in esame (ml)		Reagenti e mezzi (ml)		
	Soluzione madre a) 10 g/l par. 18	Soluzione madre b) 1 g/l par. 18	Acqua di diluizione par. 14	Inoculo par. 16	Substrato par. 17
0	—	0	1,0	100	2
1	—	0,1	0,9	100	2
3,3	—	0,33	0,67	100	2
10	0,1	—	0,9	100	2
33	0,33	—	0,67	100	2
100	1,0	—	0	100	2

Volume totale della bottiglia = 160 ml. Volume del liquido = 103 ml.

Volume di gas = 57 ml, ovvero il 35,6 % del volume totale.

30. Analogamente, bonificare con azoto un numero sufficiente di bottiglie di prova vuote per poter far fronte a eventuali sostanze liquide volatili o insolubili (cfr. paragrafo 27).

Controlli e sostanza chimica di riferimento

31. Preparare lotti di bottiglie per almeno tre repliche, contenenti solo fanghi e substrato, che fungeranno da controlli. Preparare altre due bottiglie di replica contenenti fanghi e substrato addizionato di una quantità sufficiente di soluzione madre della sostanza di riferimento, 3,5 diclorofenolo (paragrafo 21), per arrivare alla concentrazione finale di 150 mg/l. Questa concentrazione dovrebbe inibire del 50 % circa la produzione di gas. È inoltre possibile preparare la sostanza di riferimento a diverse concentrazioni all'interno di un intervallo. Preparare quattro ulteriori bottiglie che serviranno per misurare il pH e che conterranno fanghi, acqua deossigenata e substrato. Aggiungere a due bottiglie la sostanza chimica in esame alla concentrazione massima per la prova e aggiungere alle rimanenti due bottiglie acqua deossigenata.

32. Assicurarsi che tutte le bottiglie — con le sostanze chimiche in esame e di riferimento e con i controlli — contengano lo stesso volume (V_R) di liquido; se necessario, aggiungere acqua deionizzata deoxygenata (paragrafo 14) per aggiustare il volume. Lo spazio di testa deve risultare tra il 10 % e il 40 % del volume della bottiglia; il valore effettivo va selezionato a partire dai dati ottenuti in base alla prova preliminare. Dopo l'aggiunta di tutti i componenti alle bottiglie, rimuovere l'ago che fornisce il gas e sigillare ciascuna bottiglia con un tappo di gomma e un cappuccio di alluminio (paragrafo 12 (b)) inumidendo il tappo con una goccia d'acqua deionizzata per favorire l'inserimento. Agitare per mescolare il contenuto di ciascuna bottiglia.

Incubazione delle bottiglie

33. Trasferire le bottiglie in un incubatore termostatato, preferibilmente dotato di un agitatore, e mantenuto a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Le bottiglie sono incubate al buio. Dopo circa 1 ora, equilibrare la pressione nelle bottiglie con la pressione atmosferica inserendo l'ago della siringa, collegato al manometro (paragrafo 12 (c)), attraverso il sigillo delle bottiglie, una alla volta, aprire la valvola fino a quando il manometro indica zero e infine chiuderla. L'ago va inserito con un angolo di circa 45° per evitare fughe di gas dalle bottiglie. Se le bottiglie incubate sono prive di agitatore, agitarle manualmente due volte al giorno durante l'intero periodo di incubazione per equilibrare il sistema. Incubare le bottiglie in posizione capovolta per evitare qualsiasi perdita di gas dal setto. Non è tuttavia consigliato invertire le bottiglie nei casi in cui le sostanze chimiche insolubili in esame possono aderire al fondo.

Misurazione della pressione

34. Quando le bottiglie hanno raggiunto i $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, misurare e registrare il pH del contenuto di due delle quattro bottiglie allestite all'uovo, ed eliminarlo; continuare ad incubare al buio le bottiglie rimanenti. Misurare e registrare la pressione nelle bottiglie due volte al giorno nell'arco delle successive 48-72 ore, inserendo l'ago del manometro nel sigillo delle bottiglie, una alla volta, asciugando l'ago tra le misurazioni. Nel corso della misurazione, da svolgere il più velocemente possibile, tutte le parti della bottiglia vanno mantenute alla temperatura di incubazione. Leggere e registrare la pressione una volta stabilizzata. Successivamente, aprire la valvola di ventilazione e chiuderla quando la pressione è pari a zero. La prova dura, in genere, 48 ore a partire dal momento in cui la pressione è stata equilibrata per la prima volta, designato come "momento 0". Per le sostanze chimiche volatili si procede a una sola lettura e ventilazione (alla fine dell'incubazione) o al massimo a due, per minimizzare la perdita di sostanza chimica in esame (10).
35. Se la lettura della pressione dà un risultato negativo, non aprire la valvola. Talvolta nell'ago e nel corpo della siringa si accumula dell'umidità, che si traduce in un valore della pressione leggermente negativo. In questo caso, rimuovere l'ago, agitare il tubo, asciugare con un fazzoletto di carta e fissare un nuovo ago.

Misurazione del pH

36. Misurare e registrare il pH del contenuto di ciascuna bottiglia dopo la misurazione della pressione finale.

DATI E RELAZIONE

Espressione dei risultati

37. Calcolare la somma e la media delle pressioni rilevate in ciascun intervallo di tempo per ogni serie di repliche e calcolare la pressione media cumulata lorda del gas ad ogni intervallo di tempo per ogni serie di repliche. Tracciare le curve della produzione media cumulata di gas (Pa) in base al tempo, per le bottiglie di controllo, di prova e di riferimento. Selezionare un intervallo di tempo sulla parte lineare della curva, generalmente 48 ore, e calcolare la percentuale di inibizione (I) di ciascuna concentrazione, in base all'equazione [1]:

$$I = (1 - P_t/P_c) \times 100 \quad [1],$$

dove

I = percentuale di inibizione, in %;

P_t = pressione gassosa prodotta con il materiale di prova in un tempo determinato, in Pascal (Pa);

P_c = pressione gassosa prodotta nel controllo nello stesso intervallo di tempo, in Pascal (Pa).

Sarebbe opportuno tracciare entrambe le curve, la curva I in base alla concentrazione, e una seconda curva in base al logaritmo della concentrazione, in modo da poter scegliere la curva più vicina alla linearità. Valutare il valore di EC₅₀ (mg/l) visivamente o tramite analisi di regressione a partire dalla curva più vicina alla linearità. A fini comparativi può essere più utile esprimere la concentrazione della sostanza chimica in mg di sostanza chimica/g di solidi secchi totali. Al fine di ottenere questa concentrazione, è sufficiente dividere la concentrazione volumetrica (mg/l) per la concentrazione volumetrica dei solidi secchi nei fanghi (g/l) (paragrafo 16).

38. Calcolare la percentuale di inibizione ottenuta dall'unica concentrazione della sostanza chimica di riferimento utilizzata, oppure il valore EC₅₀ se è stato esaminato un numero sufficiente di concentrazioni.
39. Convertire il valore della pressione media del gas prodotto nella bottiglia di controllo P_c (Pa) in volume facendo riferimento alla curva di taratura del manometro (appendice 2), calcolando da qui il rendimento del gas, espresso in termini di volume prodotto in 48 ore da 100 ml di fanghi non diluiti con una concentrazione di solidi dal 2 % (20 g/l) al 4 % (40 g/l).

Criteri di validità

40. I risultati della prova interlaboratorio ISO (5) dimostrano che la sostanza chimica di riferimento (3,5-diclorofenolo) causa un'inibizione del 50 % della produzione di gas in un intervallo di concentrazioni che va da 32 mg/l a 510 mg/l, con una media di 153 mg/l (paragrafo 10). L'intervallo è così ampio che impedisce di fissare limiti precisi per l'inibizione utilizzabili come criteri di validità, che saranno disponibili solo quando saranno messe a punto tecniche di produzione di inoculo meno variabili. I volumi di gas prodotti nelle bottiglie di controllo nelle 48 ore variavano da 21 ml/g a 149 ml/g di materia secca dei fanghi (media 72 ml/g). Non è stato possibile stabilire alcuna relazione evidente tra il volume del gas prodotto e il corrispondente valore di EC₅₀. Il pH finale era compreso tra 6,1 e 7,5.
41. La prova è considerata valida se si ottiene un'inibizione superiore al 20 % nel controllo di riferimento contenente 150 mg/l di 3,5-diclorofenolo, se nel controllo in bianco vengono prodotti più di 50 ml di gas per g di sostanza secca e se il valore del pH è compreso nell'intervallo tra 6,2 e 7,5 alla fine della prova.

Relazione sulla prova

42. La relazione sulla prova deve comprendere le informazioni riportate di seguito.

Sostanza chimica in esame

- nome comune, nome chimico, numero CAS, formula strutturale e proprietà fisico-chimiche pertinenti;
- purezza (presenza di impurità) della sostanza in esame.

Condizioni sperimentali

- volume del contenuto liquido e dello spazio di testa nei recipienti di prova;
- descrizione dei recipienti di prova e della misurazione del gas (ad esempio, tipo di manometro);
- applicazione della sostanza chimica in esame e della sostanza chimica di riferimento nel sistema sperimentale, concentrazioni di prova utilizzate e uso di eventuali solventi;
- dettagli sull'inoculo utilizzato: nome dell'impianto di trattamento dei liquami, descrizione della fonte di acque reflue trattate (es. temperatura di funzionamento, tempo di ritenzione dei fanghi, origine principalmente domestica o liquami industriali ecc.), concentrazione dei solidi, attività di produzione di gas dei digestori anaerobici, precedente esposizione o possibile preadattamento a sostanze chimiche tossiche oppure sito di raccolta di fanghiglia, sedimenti ecc.;
- temperature di incubazione e loro intervallo;
- numero di repliche.

Risultati

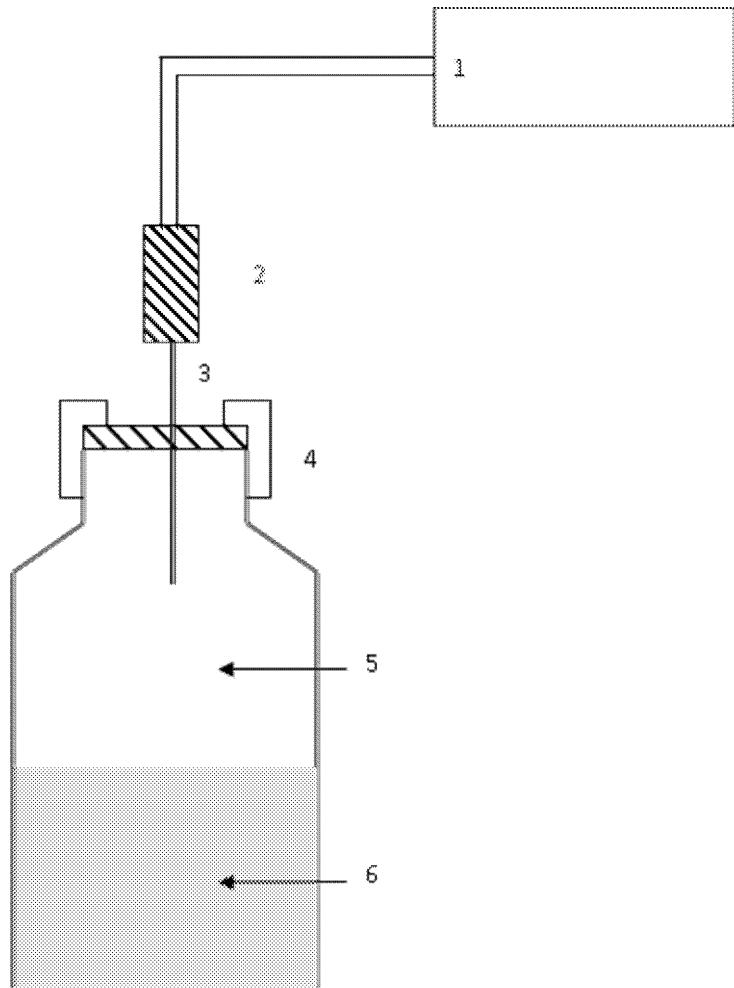
- valori del pH al termine della prova;
- tutti i valori misurati nei recipienti di prova, nei bianchi e nei controlli contenuti la sostanza di riferimento, come opportuno (cioè in Pa o millibar) sotto forma di tabella;
- percentuale di inibizione nelle bottiglie di prova e di riferimento, e curve inibizione-concentrazione;
- calcolo dei valori EC₅₀, espressi in mg/l e mg/g;
- produzione di gas per g di fanghi in 48 ore;
- giustificazione in caso dell'eventuale rigetto dei risultati della prova;
- discussione dei risultati, comprese le eventuali deviazioni dalle procedure descritte nel presente metodo di prova e discussione di eventuali deviazioni nei risultati della prova rispetto a quelli attesi dovute a interferenze ed errori;
- spiegazioni che chiariscano se l'obiettivo della prova era la misurazione della tossicità di microrganismi precedentemente esposti oppure non esposti.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Capitolo C.11 del presente allegato: Fanghi attivi — saggio di inibizione della respirazione.
- (2) Capitolo C.43 del presente allegato: Biodegradabilità anaerobica delle sostanze organiche nei fanghi digeriti — misurazione della produzione di gas.
- (3) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1: General Test.
- (4) International Organisation for Standardisation (2003) ISO 13 641-2 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 2: Test for low biomass concentrations.
- (5) ISO (2000) Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.
- (6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. *Wat. Pollut. Control*, 70, 58-70.
- (7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, In: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.
- (8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Env. Microbiol.* 47 850-857.
- (9) Battersby NS and Wilson V (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. *Chemosphere* 17, 2441-2460.
- (10) Wilson V, Painter HA and Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods, GSF Forschungszentrum, Neuherberg, Germany (1990). Eds. Steinberg C and Kettrup A, pp117-132 (1992).

-
- (11) Kawahara K, Yakabe Y, Chida T, and Kida K (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. *Chemosphere*, 39 (12), 2007-2018.
 - (12) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
 - (13) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.
-

Appendice 1

Esempio di apparecchio per misurare la produzione di biogas tramite pressione gassosa*Legenda:*

- 1 — Manometro
- 2 — Valvola a tre vie a tenuta di gas
- 3 — Ago per siringa
- 4 — Sigillo a tenuta stagna contro la fuoriuscita di gas (tappo a vite e setto)
- 5 — Spazio di testa
- 6 — Inoculo di fanghi digeriti

Recipienti di prova in ambiente a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

Appendice 2

Conversione del manometro

Le pressioni lette sul manometro possono essere rapportate a volumi gassosi grazie a una curva di riferimento a partire dalla quale è possibile calcolare il volume di gas prodotto per grammo di fanghi secchi in 48 ore. Questo indice di attività è uno dei criteri utilizzati per valutare la validità dei risultati delle prove. La curva di taratura è prodotta iniettando determinati valori di gas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ nelle bottiglie da siero contenenti un volume di acqua pari a quello della miscela di reazione, V_R :

- versare delle aliquote V_R ml di acqua, mantenuta a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ in cinque bottiglie da siero. Sigillare le bottiglie e posarle in un bagnomaria a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ per un'ora per equilibrarle;
- accendere il manometro, attendere finché si sia stabilizzato, e regolare su zero;
- inserire l'ago della siringa attraverso il sigillo di una delle bottiglie, aprire la valvola fino a che il manometro dia zero e chiudere la valvola;
- ripetere questa procedura con le bottiglie restanti;
- iniettare 1 ml di aria a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ in ciascuna bottiglia. Inserire l'ago (del manometro) attraverso il sigillo di una delle bottiglie e lasciar stabilizzare la lettura della pressione. Registrare la pressione, aprire la valvola fino a quando la pressione è pari a zero e poi richiederla;
- ripetere questa procedura con le bottiglie restanti;
- ripetere l'intera procedura utilizzando 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml e 50 ml di aria;
- tracciare una curva di conversione della pressione (Pa) in base al volume di gas iniettato (ml). La risposta dello strumento è lineare nell'intervallo da 0 Pa a 70 000 Pa, e da 0 ml a 50 ml di produzione di gas.

Appendice 3

Identificazione dei fattori all'origine di risultati erronei

a) Qualità dei tappi per le bottiglie

In commercio sono disponibili diversi tipi di setti per le bottiglie di siero; molti di essi, inclusi quelli in gomma di butile, non sono più stagni se perforati da un ago come richiesto dal protocollo della prova. A volte la pressione scende molto lentamente una volta che il setto è stato perforato con l'ago della siringa. È raccomandato l'uso di setti a tenuta di gas per evitare perdite (paragrafo 12 (b)).

b) Umidità nell'ago della siringa

Talvolta nell'ago della siringa si accumula dell'umidità, che si traduce in un valore della pressione leggermente negativo. In questo caso, rimuovere l'ago, agitare il corpo della siringa, asciugare con un fazzoletto di carta e fissare un nuovo ago (paragrafi 12 (c) e 35).

c) Contaminazione da ossigeno

I metodi anaerobici sono soggetti a errore derivante da contaminazioni da ossigeno, che può portare a una riduzione della produzione di gas. In questo metodo tale eventualità va ridotta al minimo attraverso l'utilizzo di tecniche rigorosamente anaerobiche, compreso l'uso di una scatola a guanti.

d) Substrato grossolano nei fanghi

La produzione di gas anaerobica e la sensibilità del fango sono influenzate dai substrati trasferiti con l'inoculo nelle bottiglie. I fanghi digeriti provenienti dai digestori domestici anaerobici spesso contengono ancora delle materie riconoscibili, quali peli e residui vegetali della cellulosa, che complicano il prelievo di campioni rappresentativi. Le materie insolubili grossolane possono essere eliminate utilizzando un setaccio, facilitando in tal modo il prelievo di campioni rappresentativi (paragrafo 16).

e) Sostanze chimiche volatili in esame

Le sostanze chimiche volatili vengono liberate nello spazio di testa delle bottiglie. Ciò può comportare la perdita di una parte del materiale di prova dal sistema durante lo sfiato che segue alla misurazione della pressione, portando ad ottenere valori di EC₅₀ erroneamente elevati. È possibile limitare questo tipo di errore scegliendo un rapporto corretto tra volume dello spazio di testa e volume liquido ed evitando di procedere allo sfiato dopo aver misurato la pressione (10).

f) Non linearità della produzione di gas

Se la curva della produzione cumulata media di gas rispetto al tempo di incubazione non è approssimativamente lineare sulle 48 ore, l'esattezza della prova può diminuire. Per ovviare a questo problema, è consigliabile utilizzare fanghi digestori provenienti da una fonte diversa e/o aggiungere una concentrazione più alta di substrato di prova, di brodo nutriente, di estratto di lievito e di glucosio (paragrafo 29).

Appendice 4

Applicazione a campioni ambientali a bassa concentrazione di biomassa — fanghiglie anaerobiche, sedimenti ecc.

INTRODUZIONE

- A.1 In generale, le attività microbiche specifiche (volume di gas prodotto per g di solidi secchi) delle fanghiglie anaerobiche, dei sedimenti, dei suoli e di quant’altro presente in natura sono di gran lunga inferiori a quelle dei fanghi anaerobici derivanti da acque reflue. Per questo motivo è necessario modificare alcune delle condizioni sperimentalì quando devono essere misurati gli effetti inibitori delle sostanze chimiche su questi campioni meno attivi. Per i campioni meno attivi, è possibile procedere in due modi:
- eseguire una prova preliminare modificata (paragrafo 25) con un campione non diluito di fanghiglia, suolo ecc. a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ o alla temperatura del luogo di raccolta del campione, per ottimizzare la simulazione (come nella parte 1 della norma ISO 13 641);
 - eseguire una prova con un digestore diluito (1:100) per simulare l’attività ridotta che ci si attende dal campione ambientale, pur mantenendo la temperatura a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (come nella parte 2 della norma ISO 13 641).
- A.2 L’opzione a) può essere adottata seguendo il metodo qui descritto (equivalente alla parte 1 della norma ISO 13 641), ma è essenziale allestire una prova preliminare (paragrafo 25) per stabilire le condizioni ottimali, a meno che queste ultime non siano già note grazie a prove precedentemente eseguite. La fanghiglia o il campione di sedimento devono essere accuratamente mescolati, ad esempio in un miscelatore, e, se necessario, diluiti con una piccola quantità di acqua di diluizione deaerata (paragrafo 14) in modo da essere sufficientemente mobili per poter essere trasferiti con una pipetta con puntale a foro largo o una provetta graduata. Se si ritiene che gli elementi nutritivi siano insufficienti, il campione di fanghiglia può essere centrifugato (in condizioni anaerobiche) e risospeso nel mezzo minerale contenente estratto di lievito (A. 11).
- A.3 L’opzione b) riproduce ragionevolmente l’attività ridotta dei campioni ambientali, ma senza l’alta concentrazione di solidi sospesi che caratterizza invece questo tipo di campioni. Il ruolo ricoperto da questi solidi per l’inibizione non è noto, ma è possibile che la reazione tra le sostanze chimiche in esame e i componenti della fanghiglia, nonché l’adsorbimento delle sostanze in esame sui solidi, comportino un abbassamento della tossicità della sostanza chimica in esame.
- A.4 La temperatura è un altro fattore importante: una simulazione rigorosa impone di eseguire le prove alla stessa temperatura dei siti di campionatura, in quanto è noto che gruppi diversi di consorzi di batteri producenti metano operano a intervalli di temperature diverse, segnatamente i gruppi termofili ($\sim 30\text{-}35^{\circ}\text{C}$), mesofili ($20\text{-}25^{\circ}\text{C}$) e psicrofili ($< 20^{\circ}\text{C}$), i cui modelli di inibizione possono differire.
- A.5 Durata: nella prova generale, parte 1, su fanghi non diluiti, la produzione di gas nell’arco di 2-4 giorni era sempre sufficiente, mentre nella parte 2, su fanghi diluiti 1:100, la produzione nello stesso arco di tempo era insufficiente o assente, secondo la prova interlaboratorio. Nel descrivere quest’ultima prova Madsen et al (1996), affermano che sia necessaria una durata di almeno 7 giorni.

Prova con una bassa concentrazione di biomassa (opzione b)

Occorre apportare le modifiche e i cambiamenti seguenti, in aggiunta o in sostituzione di alcuni paragrafi e sottoparagrafi del testo principale.

- A.6 In aggiunta al paragrafo 6: Principio della prova

“Questa tecnica può essere utilizzata con fanghi aerobici diluiti 1:100, per simulare in parte la debole attività della fanghiglia e dei sedimenti. La temperatura di incubazione può essere di 35°C o equivalente a quella del sito in cui il campione è stato prelevato. Poiché l’attività batterica è molto inferiore rispetto a quella nei fanghi non diluiti, il periodo di incubazione va esteso ad almeno 7 giorni.”

- A.7 In aggiunta al paragrafo 12 (a):

“l’incubatore deve poter continuare ad operare scendendo fino a temperature di 15°C .”

A.8 Aggiungere un ulteriore reagente dopo il paragrafo 13:

“Acido fosforico (H_3PO_4), 85 % in massa nell'acqua.”

A.9 Aggiungere alla fine del paragrafo 16:

“Utilizzare una concentrazione finale di $0,20 \pm 0,05$ g/l di solidi secchi totali nella prova.”

A.10 Paragrafo 17. Substrato per la prova

Il substrato non deve essere utilizzato, ma è sostituito da estratto di lievito (cfr. paragrafi 17; A.11, A.12, A.13).

A.11 I fanghi anaerobici devono essere diluiti con mezzo minerale, contenente oligoelementi, e per comodità a tale mezzo viene aggiunto del substrato organico, ossia estratto di lievito.

In aggiunta al paragrafo 17:

“(a) Mezzo minerale di prova, contenente estratto di lievito.

Viene preparato a partire da un mezzo di prova concentrato 10 volte (paragrafo 17 (b); A. 12) con una soluzione di oligoelementi (paragrafo 17, (c); A.13). Utilizzare solfuro di sodio nonaidrato preparato al momento (paragrafo 17 (b); A.12) o lavato e seccato prima dell'uso al fine di assicurarsi che possieda sufficienti capacità riduttive. Se la prova è condotta senza utilizzare una scatola a guanti (paragrafo 12 (j)), la concentrazione di solfuro di sodio nella soluzione madre deve essere aumentata fino a 2 g/l (da 1 g/l). Il solfuro di sodio può essere aggiunto a partire da una soluzione madre appropriata attraverso il setto delle bottiglie di prova chiuse, in quanto tale procedura riduce il rischio di ossidazione, per ottenere una concentrazione finale di 0,2 g/l. In alternativa, è possibile utilizzare citrato di titanio (III) (paragrafo 17 (b)), che va aggiunto attraverso il setto delle bottiglie di prova chiuse, fino a ottenere una concentrazione da 0,8 mmol/l a 1,0 mmol/l. Il citrato di titanio (III) è un agente riduttore molto efficace e poco tossico, che si può preparare così: sciogliere 2,94 g di citrato trisodico biidrato in 50 ml di acqua di diluizione priva di ossigeno (paragrafo 14) fino a ottenere una soluzione di 200 mmol/l; aggiungere 5 ml di una soluzione di cloruro di titanio (III) (15 g/100 ml di acqua di diluizione). Neutralizzare a pH $7 \pm 0,5$ con carbonato di sodio e versare in un'opportuna bottiglia da siero esponendo la soluzione a un flusso di gas di azoto. La concentrazione di citrato di titanio (III) in questa soluzione madre è di 164 mmol/l. Il mezzo di prova va utilizzato immediatamente o conservato a 4 °C per una giornata al massimo.

A.12 (b) mezzo di prova concentrato dieci volte, preparato con i seguenti componenti:

diidrogenofosfato di potassio anidro (KH_2PO_4)	2,7 g
idrogenofosfato di sodio (Na_2HPO_4)	4,4 g
(o 11,2 g di dodecaidrato)	5,3 g
cloruro di ammonio (NH_4Cl)	
cloruro di calcio diidrato ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g
cloruro di magnesio esaидrato ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
cloruro ferroso (II) tetraidrato ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,2 g
resazurina (indicatore di ossidoriduzione)	0,01 g
sodio solfuro nonaidrato ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	1,0 g
(o citrato di titanio (III)) concentrazione finale	da 0,8 mmol/l a 1,0 mmol/l
soluzione di oligoelementi (cfr. paragrafo 17 (c); A. 13)	10,0 ml
estratto di lievito	100 g
sciogliere in acqua di diluizione (paragrafo 14) e portare a:	1 000 ml

A.13 c) Soluzione di oligoelementi, preparata con i seguenti componenti:

cloruro di manganese (II) tetraidrato ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,5 g
acido ortoborico (H_3BO_3)	0,05 g

cloruro di zinco ($ZnCl_2$)	0,05 g
cloruro di rame (II) ($CuCl_2$)	0,03 g
molibdato di disodio diidrato ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0,01 g
cloruro di cobalto (II) esaidsrato ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
cloruro di nichel (II) esaidsrato ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,1 g
selenito di sodio (Na_2SeO_3)	0,05 g
sciogliere in acqua di diluizione (paragrafo 14) e portare a:	1 000 ml"

A.14 Paragrafo 25: Prova preliminare

È essenziale svolgere una prova preliminare come descritto al paragrafo 24, ma utilizzando invece concentrazioni di materie solide dei fanghi pari a un centesimo di quelle indicate, vale a dire 0,1g/l, 0,2g/l e 0,4g/l. Il periodo di incubazione deve essere di almeno 7 giorni.

Nota: nella prova interlaboratorio (5) il volume dello spazio di testa era troppo elevato, rappresentando il 75 % del volume totale; deve invece collocarsi nell'intervallo raccomandato, cioè dal 10 % al 40 %. Il criterio fondamentale da soddisfare riguarda l'ottenimento di un volume di gas prodotto che sia misurabile con una precisione accettabile (ad esempio, da $\pm 5\%$ a $\pm 10\%$) per un'inibizione pari a circa l'80 %.

A.15 Paragrafi da 26 a 30: Aggiunta della sostanza chimica in esame, dell'inoculo e del substrato.

Le aggiunte sono effettuate nel modo descritto nei paragrafi che precedono, ma la soluzione di substrato (paragrafo 17) è sostituita da mezzo di prova più substrato di estratto di lievito (A.11).

Inoltre, la concentrazione finale di solidi secchi nei fanghi è ridotta da 2 g/l — 4 g/l a 0,2 \pm 0,05 g/l (A.9). Due esempi di aggiunta di componenti alla miscela di prova sono riportati nella tabella A.1, che sostituisce la tabella di cui al paragrafo 29.

A.16 Paragrafo 33: Incubazione delle bottiglie

In previsione del calo della produzione di gas, l'incubazione si svolge per almeno 7 giorni.

A.17 Paragrafo 34: Misurazioni della pressione

La stessa procedura usata per misurare la pressione nello spazio di testa delle bottiglie viene utilizzata come indicato al paragrafo 34, qualora sia necessario analizzare le quantità nella fase gassosa. Se è necessario misurare le quantità totali di CO_2 e di CH_4 , il pH della fase liquida è ridotto a circa pH 2 con l'inezione H_3PO_4 in ogni bottiglia coinvolta e la pressione viene misurata dopo un'agitazione di 30 minuti alla temperatura della prova. Tuttavia, la misurazione della pressione in ciascuna bottiglia prima e dopo l'acidificazione fornisce maggiori informazioni sulla qualità dell'inoculo. Ad esempio, se la CO_2 viene prodotta molto più rapidamente rispetto al metano, la sensibilità dei batteri fermentatori può essere modificata e/o la sostanza chimica in esame incide più facilmente sui batteri metanogeni.

A.18 Paragrafo 36: misurazione del pH

Se è necessario usare H_3PO_4 , occorre preparare alcune bottiglie supplementari senza aggiunta di H_3PO_4 , in particolare per la misurazione del pH.

RIFERIMENTO:

Madsen, T, Rasmussen, HB; and Nilsson, L (1996), *Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals*. Project No. 336, Water Quality Institute, Danish Environment Protection Agency, Copenhagen.

Tabella A.1.

Esempi della configurazione di prova per lotti sottoposti a esame

Componenti della miscela di reazione	Esempio 1	Esempio 2	Ordine normale di aggiunta
Concentrazione di inoculo preparato (g/l)	0,42	2,1	—
Volume dell'inoculo aggiunto (ml)	45	9	4
Concentrazione dell'inoculo nelle bottiglie di prova (g/l)	0,20	0,20	—
Volume del mezzo di prova aggiunto (ml)	9	9	2
Volume dell'acqua di diluizione aggiunta (ml)	36	72	3
Concentrazione dell'estratto di lievito nelle bottiglie di prova (g/l)	9,7	9,7	—
Volume della soluzione madre della sostanza chimica in esame (ml)	3	3	1
Volume di liquido totale (ml)	93	93	—

*Appendice 5***Definizioni**

Ai fini del presente metodo si applicano le seguenti definizioni:

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata seguendo il presente metodo di prova.

C.35 PROVA DI TOSSICITÀ SU LUMBRICULUS IN ACQUA-SEDIMENTO CON SEDIMENTO ADDIZIONATO**INTRODUZIONE**

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 225 (2007). Gli animali endobentici che ingeriscono sedimento sono soggetti a un rischio potenzialmente elevato di esposizione a sostanze chimiche presenti nello stesso sedimento e richiedono pertanto particolare attenzione, ad es. (1), (2), (3). Tra gli organismi di questo tipo gli oligocheti acquatici svolgono un ruolo importante nel sedimento dei sistemi acquisiti. Mediante la bioturbazione del sedimento e come animali da preda, essi possono influenzare fortemente la biodisponibilità delle sostanze chimiche in oggetto per altri organismi, ad esempio i pesci che si cibano di bentos. Contrariamente agli organismi epibentici, gli oligocheti acquatici endobentici (ad esempio il *Lumbriculus variegatus*) si infossano nel sedimento e ingeriscono particelle di sedimento al di sotto della sua superficie. Ciò garantisce l'esposizione degli organismi sperimentali alla sostanza chimica in esame per tutte le vie di assorbimento possibili (ad esempio attraverso il contatto con particelle di sedimento contaminate e la loro ingestione, ma anche per mezzo dell'acqua interstiziale e sovrastante).
2. Questo metodo di prova è inteso a valutare gli effetti di un'esposizione prolungata dell'oligochete endobentico *Lumbriculus variegatus* (Müller) a sostanze chimiche associate al sedimento. Il metodo di prova si basa sugli attuali protocolli di prova sul bioaccumulo e sulla tossicità del sedimento, ad esempio (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Il metodo è descritto per condizioni di prova statiche. Questo metodo prevede che l'esposizione alla sostanza chimica in esame avvenga a mezzo di sedimento addizionato con la sostanza chimica in esame. Il sedimento addizionato è usato per simulare una contaminazione del sedimento con la sostanza chimica in esame.
3. In genere le sostanze chimiche da saggiare su organismi che vivono nel sedimento persistono a lungo in questo comparto. L'esposizione di questi organismi può avvenire per diverse vie. L'importanza relativa di ogni via di esposizione e il tempo impiegato da ciascuna di esse per contribuire all'effetto tossico globale dipendono dalle proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica in esame e dalla sua destinazione finale nell'animale. Per le sostanze chimiche fortemente adsorbenti (ad esempio, con $\log K_{ow} > 5$) oppure per le sostanze chimiche che si legano in modo covalente al sedimento, l'ingestione di alimenti contaminati può costituire una via di esposizione importante. Per non sottovalutare la tossicità delle sostanze chimiche in oggetto, l'alimento necessario per la riproduzione e la crescita degli organismi sperimentali è aggiunto al sedimento prima di applicare la sostanza chimica in esame (11). Il metodo di prova descritto è sufficientemente dettagliato da permettere, durante lo svolgimento della prova, adeguamenti al disegno sperimentale in funzione di particolari condizioni di laboratorio e delle varie caratteristiche delle sostanze in esame.
4. Il metodo di prova mira a determinare gli effetti della sostanza chimica in esame sulla riproduzione e la biomassa degli organismi sperimentali. I parametri biologici misurati sono il numero totale di vermi sopravvissuti e la biomassa (peso secco) alla fine dell'esposizione. I dati sono analizzati tramite un modello di regressione per stimare la concentrazione che causerebbe un effetto dell'x % ((ad es. EC₅₀, EC₂₅ ed EC₁₀), oppure mediante verifica di un'ipotesi statistica per determinare la concentrazione senza effetti osservabili (No Observed Effect Concentration — NOEC) e la concentrazione minima a cui si osserva un effetto statisticamente significativo (Lowest Observed Effect Concentration — LOEC)).
5. Il capitolo C. 27 del presente allegato, intitolato "Prova di tossicità su chironomide in acqua-sedimento con sedimento addizionato" (6) ha fornito numerosi dettagli essenziali e utili sulle prestazioni del metodo di prova sulla tossicità del sedimento presentato. Pertanto, questo documento è servito da base per apportare le modifiche necessarie per lo svolgimento delle prove di tossicità nel sedimento sul *Lumbriculus variegatus*. Tra gli ulteriori documenti di riferimento figurano, ad esempio, il manuale dell'ASTM "ASTM Standard Guide for Determination of the Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants by Benthic Invertebrates (3)", gli "U.S. EPA Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates" (7) e la "ASTM Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates" (12). Inoltre per la redazione del presente documento le principali fonti di riferimento sono stati i dati empirici ottenuti nel corso di prove interlaboratorio (13) (relazione sulle prove interlaboratorio) e le informazioni dettagliate tratte dalla letteratura scientifica.

PREREQUISITI E ORIENTAMENTI

6. Le informazioni sulla sostanza chimica in esame come le precauzioni, le condizioni di conservazione adeguate e i metodi di analisi vanno ottenute prima dell'inizio dello studio. Gli orientamenti relativi alle prove delle sostanze chimiche con caratteristiche fisico-chimiche che rendono difficoltosa l'esecuzione delle prove sono contenuti in (14).

7. Prima di procedere a una prova, devono essere note le seguenti informazioni sulla sostanza chimica in esame:
 - nome comune, nome chimico (di preferenza nome IUPAC), formula strutturale, numero CAS, purezza;
 - tensione di vapore;
 - idrosolubilità;
8. Le seguenti informazioni supplementari sono ritenute utili prima dell'inizio della prova:
 - coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua K_{ow} ;
 - coefficiente di ripartizione carbone organico/acqua, espresso come K_{oc} ;
 - idrolisi;
 - fototrasformazione in acqua;
 - biodegradabilità;
 - tensione superficiale.
9. Le informazioni su alcune caratteristiche del sedimento da utilizzare vanno acquisite prima dell'inizio della prova (7). Per maggiori dettagli, cfr. i paragrafi da 22 a 25.

PRINCIPIO DELLA PROVA

10. I vermi che presentano uno stato fisiologico simile (sincronizzati come descritto nell'appendice 5) sono esposti a una serie di concentrazioni di sostanze tossiche applicate nella fase di sedimentazione di un sistema sedimento-acqua. Il sedimento artificiale e l'acqua ricostituita vanno utilizzati come mezzi. Dei recipienti di prova senza l'aggiunta della sostanza chimica di prova fungono da controllo. La sostanza chimica in esame è addizionata al sedimento per ciascun livello di concentrazione al fine di ridurre al minimo la variabilità tra le repliche di ciascun livello di concentrazione. Gli organismi sperimentali sono successivamente introdotti nei recipienti di prova in cui sono state equilibrate le concentrazioni sedimento-acqua (cfr. paragrafo 29). Gli animali sperimentali vengono esposti ai sistemi sedimento-acqua per un periodo di 28 giorni. In considerazione del basso contenuto nutritivo del sedimento artificiale, il sedimento va arricchito con una fonte alimentare (cfr. i paragrafi 22 e 23 e l'appendice 4) per garantire che i vermi possano crescere e riprodursi in condizioni controllate. In questo modo si assicura inoltre che l'esposizione degli animali sperimentali avvenga sia attraverso l'acqua, sia attraverso l'alimentazione.
11. L'endpoint preferenziale di questo tipo di studio è EC_x (ad es. EC_{50} , EC_{25} , and EC_{10} ; concentrazione con un effetto sull'x % degli organismi sperimentali) per la riproduzione e la biomassa, rispettivamente, rispetto al controllo. Va tuttavia notato che, considerata l'elevata incertezza di EC_x a basso valore (ad es. EC_{10} , EC_{25}) con limiti di confidenza estremamente elevati del 95 % (ad es. (15)) e il potere statistico calcolato nel corso delle verifiche dell'ipotesi, EC_{50} è ritenuto l'endpoint più affidabile. Inoltre, la NOEC e la LOEC possono essere calcolate per la biomassa e la riproduzione se il disegno sperimentale e i dati confermano tali calcoli (cfr. paragrafi da 34 a 38). La finalità dello studio — calcolo della EC_x o della NOEC — determinerà il disegno sperimentale.

PROVE DI RIFERIMENTO

12. Si prevede che per dimostrare la capacità di esecuzione della prova di un laboratorio siano sufficienti le prestazioni degli organismi di controllo e, in caso di disponibilità di dati storici, la ripetibilità della prova. Inoltre, a intervalli regolari possono essere eseguite prove di tossicità di riferimento utilizzando un tossico di riferimento per valutare la sensibilità degli organismi sperimentali. Le prove di tossicità di riferimento in acqua a 96 h dovrebbero essere sufficienti per dimostrare la sensibilità e la condizione degli animali sperimentali (4) (7). Le informazioni sulla tossicità del pentaclorofenolo (PCP) in prove complete (esposizione al sedimento addizionato per 28 giorni) figurano nell'appendice 6 e nella relazione sulla prova interlaboratorio del metodo di prova (13). La tossicità acuta del PCP in presenza di sola acqua è descritta, ad esempio, in (16). Queste informazioni possono essere usate per il confronto della sensibilità dell'organismo sperimentale nelle prove di riferimento in cui il PCP è usato come tossico di riferimento. Il cloruro di potassio (KCl) o il solfato di rame ($(CuSO_4)$) sono stati raccomandati come tossici di riferimento per il *L. variegatus* (4)(7). Ad oggi, la determinazione dei criteri di qualità basati sui dati di tossicità per KCl è difficile a causa della mancanza di dati desunti dalla letteratura sul *L. variegatus*. Le informazioni sulla tossicità del rame sul *L. variegatus* sono riportate nei riferimenti da (17) a (21).

VALIDITÀ DELLA PROVA

13. Affinché una prova sia valida occorre che siano soddisfatti i seguenti criteri:
 - una prova interlaboratorio (13) ha dimostrato che, per il *Lumbriculus variegatus*, il numero medio di esemplari in vita per replica nei controlli alla fine dell'esposizione deve essere aumentato di un fattore di almeno 1,8 rispetto al numero di esemplari per replica all'inizio dell'esposizione;
 - il pH dell'acqua sovrastante deve essere compreso tra 6 e 9 per tutta la durata della prova;
 - la concentrazione dell'ossigeno nell'acqua sovrastante non deve essere inferiore al 30 % del valore di saturazione in aria (ASV) alla temperatura di prova nel corso della prova.

DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

Sistema di prova

14. Sono raccomandati sistemi statici senza rinnovo dell'acqua sovrastante. Se il rapporto sedimento-acqua (cfr. il paragrafo 15) è adeguato, di norma una moderata aerazione sarà sufficiente per mantenere la qualità dell'acqua a livelli accettabili per gli organismi sperimentali (ad esempio ottimizzare i livelli di ossigeno dissolto, ridurre al minimo l'accumulo di escrezioni). I sistemi semi-statici o a flusso con rinnovo continuo o a intermittenza dell'acqua sovrastante possono essere utilizzati solo in casi eccezionali, poiché si presume che il regolare rinnovo dell'acqua sovrastante incida sull'equilibrio chimico (ad esempio perdite di sostanza chimica in esame dal sistema di prova).

Recipienti e apparecchiatura di prova

15. L'esposizione dovrebbe avvenire in becher di vetro, ad esempio con una capacità di 250 ml e un diametro di 6 cm. Possono essere utilizzati anche altri recipienti di vetro idonei, purché garantiscano profondità sufficiente ad accogliere il sedimento e l'acqua sovrastante. In ogni recipiente va versato uno strato di circa 1,5-3 cm di sedimento artificiale. Il rapporto tra la profondità dello strato sedimentario e la profondità dell'acqua sovrastante deve essere pari a 1:4. I recipienti devono presentare una capacità adeguata al tasso di carico, ossia al numero dei vermi sperimentali aggiunti per unità di peso di sedimento (cfr. anche il paragrafo 39).
16. I recipienti e gli altri apparecchi destinati ad entrare in contatto con la sostanza chimica in esame devono essere interamente di vetro o di altro materiale chimicamente inerte. Per tutte le parti dell'apparecchiatura, evitare accuratamente l'uso di materiali che rischino di provocare la dissoluzione o l'assorbimento delle sostanze chimiche in esame o la lisciviazione di altre sostanze chimiche e che possano avere un effetto avverso sugli animali sperimentali. Per le apparecchiature destinate ad entrare in contatto con il mezzo di prova si può usare politetrafluoroetilene (PTFE), acciaio inossidabile e/o vetro. Per sostanze chimiche organiche di cui è accertato l'adsorbimento di vetro, può rendersi necessario l'uso di vetro silanizzato. In tal caso le apparecchiature non possono essere riutilizzate.

Specie sperimentali

17. La specie sperimentale utilizzata in questo tipo di studio è l'oligochete di acqua dolce *Lumbriculus variegatus* (Müller). Questa specie è tollerante verso una vasta gamma di tipi di sedimento ed è ampiamente utilizzata per le prove di bioaccumulo e tossicità nel sedimento [ad esempio (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34), (35)]. Vanno riferiti sia l'origine degli animali sperimentali, sia la conferma dell'identità di specie (ad es. (36)), sia le condizioni di allevamento. Occorre identificare la specie prima dell'avvio della prova, ma non è necessario farlo prima di ogni singola prova se gli organismi sono stati allevati nel laboratorio che esegue la prova.

Allevamento degli organismi sperimentali

18. Al fine di disporre di un numero sufficiente di vermi per svolgere le prove di tossicità nel sedimento, è utile mantenere i vermi in allevamento di laboratorio permanente. Nell'appendice 5 si forniscono orientamenti relativi ai metodi di allevamento per *Lumbriculus variegatus* e fonti per allevamenti iniziali. Per maggiori dettagli si vedano i riferimenti per l'allevamento di questa specie (3), (7), (27).
19. Per garantire che le prove siano eseguite con animali della stessa specie, si raccomandano vivamente allevamenti monospecie. Si deve garantire che gli allevamenti e soprattutto i vermi usati nelle prove non presentino patologie osservabili o anomalie.

Acqua

20. Si raccomanda l'uso di acqua ricostituita di cui al capitolo C.1 del presente allegato (37) come acqua sovrastante nella prova. L'acqua ricostituita può anche essere usata per l'allevamento in laboratorio dei vermi (cfr. appendice 2 per la preparazione). Se necessario, può essere utilizzata acqua naturale. L'acqua scelta deve essere di una qualità tale da permettere la crescita e la riproduzione della specie sperimentale durante i periodi di acclimatazione e di prova senza che si manifestino un aspetto o un comportamento anomali. È appurato che il *Lumbricus variegatus* è in grado di sopravvivere, crescere e riprodursi in questo tipo di acqua (30), ed è garantita la massima standardizzazione delle condizioni di prova e di allevamento. Se si utilizza acqua artificiale ne va segnalata la composizione. Inoltre l'acqua prima dell'uso deve essere caratterizzata almeno in termini di pH, tenore di ossigeno e durezza (come mg CaCO₃/l). L'analisi dell'acqua per microinquinanti prima dell'uso potrebbe fornire informazioni utili (cfr., ad esempio, l'appendice 3).
21. Il pH dell'acqua sovrastante deve essere compreso tra 6,0 e 9,0 (cfr. il paragrafo 13). Se si prevede un aumento nello sviluppo di ammoniaca, si ritiene utile mantenere un pH compreso fra 6,0 e 8,0. Per le prove relative, ad esempio, ad acidi organici deboli, è consigliabile regolare il pH tamponando l'acqua da usare nella prova, come descritto ad esempio in (16). La durezza totale dell'acqua da usare nella prova deve essere tra 90 e 300 mg CaCO₃ per litro di acqua naturale. L'appendice 3 riassume i criteri aggiuntivi per un'acqua di diluizione accettabile conformemente alla linea guida OCSE n. 210 (38).

Sedimento

22. Poiché il sedimento naturale non contaminato da una particolare fonte può non essere disponibile nel corso di tutto l'anno e poiché organismi indigeni e microinquinanti possono influenzare la prova, è preferibile usare un sedimento artificiale (denominato anche sedimento formulato o sintetico). L'uso di un sedimento artificiale riduce al minimo la variabilità delle condizioni di prova e l'introduzione di fauna indigena. Il seguente sedimento è basato sul sedimento artificiale secondo (6), (39) e (40). Si raccomanda di utilizzarlo in questo tipo di prova ((6), (10), (30), (41), (42), (43)):
 - (a) 4-5 % (peso secco) di torba di sfagno; è importante usare la torba in polvere, livello di decomposizione: "media" finemente macinata (dimensioni delle particelle ≤ 0,5 mm), esclusivamente essicidata all'aria;
 - (b) 20 ± 1 % (peso secco) di argilla caolinica (tenore di caolinite preferibilmente superiore al 30 %);
 - (c) 75-76 % (peso secco) di sabbia di quarzo (sabbia fine, granulometria: ≤ 2 mm, ma > 50 % delle particelle di dimensioni comprese tra 50 e 200 µm);
 - (d) acqua deionizzata, pari al 30-50 % del peso secco del sedimento, oltre ai componenti secchi del sedimento;
 - (e) carbonato di calcio di qualità chimicamente pura (CaCO₃) per regolare il pH della miscela finale;
 - (f) il tenore di carbonio organico della miscela finale dovrà essere del 2 % (± 0,5 %), del peso secco del sedimento e dovrà essere ottenuto aggiungendo le dovute quantità di torba e sabbia, come indicato alle lettere a) e c);
 - (g) prodotti alimentari, ad esempio polveri di foglie di ortica (*Urtica* sp., conforme alle norme farmaceutiche, per il consumo umano), o una miscela di polveri di foglie di ortica con alfacellulosa (1: 1), a 0,4 — 0,5 % di sedimento (peso secco), oltre ai componenti secchi del sedimento. Per i dettagli cfr. l'appendice 4.
23. L'origine della torba, dell'argilla caolinica, dei prodotti alimentari e della sabbia deve essere nota. Oltre a quanto specificato alla lettera (g), il capitolo C.27 del presente allegato (6) enumera materiali vegetali alternativi da usare come fonte di nutrimento: foglie disidratate di gelso (*Morus alba*), trifoglio bianco (*Trifolium repens*), spinacio (*Spinacia oleracea*) o cereali.
24. La fonte alimentare scelta deve essere aggiunta prima o durante l'addizione al sedimento della sostanza chimica in esame. Essa dovrebbe consentire almeno una riproduzione accettabile nei controlli. La ricerca di microinquinanti nel sedimento artificiale o nei suoi componenti prima del suo utilizzo può fornire informazioni utili.

Un esempio di preparazione del sedimento artificiale figura nell'appendice 4. I componenti possono anche essere mescolati allo stato secco, purché si dimostri che dopo l'aggiunta dell'acqua sovrastante non si separino (ad esempio, particelle di torba in sospensione) e che la torba o il sedimento siano condizionati a sufficienza (cfr. anche il paragrafo 25 e l'appendice 4). Il sedimento artificiale deve essere caratterizzato almeno in termini di origine dei componenti, distribuzione granulometrica (percentuale di sabbia, limo e argilla), tenore di carbonio organico totale, tenore di acqua e pH. La misurazione del potenziale di ossido-riduzione è facoltativa.

25. Se necessario, ad esempio per specifici scopi sperimentali, può fungere da sedimento di prova e/o di coltura anche il sedimento naturale di siti non inquinati (3). Tuttavia, il sedimento naturale eventualmente usato deve essere caratterizzato almeno in termini di origine (sito di prelievo), pH e ammoniaca dell'acqua interstiziale, tenore di carbonio organico totale e tenore di azoto, distribuzione granulometrica (percentuale di sabbia, limo e argilla) e tenore di umidità (7), e deve essere esente da ogni contaminazione e da altri organismi che potrebbero entrare in concorrenza con gli organismi sperimentali o esserne predatori. La misurazione del potenziale di ossido-riduzione e della capacità di scambio cationico è facoltativa. Prima dell'addizione della sostanza chimica, si raccomanda inoltre di mantenere il sedimento naturale per sette giorni alle stesse condizioni in cui in seguito verrà realizzata la prova. Alla fine di questo periodo di condizionamento, l'acqua sovrastante deve essere rimossa ed eliminata.
26. Il sedimento deve essere di una qualità tale da permettere la sopravvivenza e la riproduzione degli organismi sperimentali per il periodo di esposizione senza che questi presentino un aspetto o un comportamento anomali. I vermi di controllo devono potersi infossare nel sedimento e devono ingerire il sedimento. La riproduzione dei controlli deve rispettare almeno i criteri di validità di cui al paragrafo 13. La presenza o l'assenza di grumi fecali sulla superficie del sedimento, che indica l'ingestione di sedimento da parte dei vermi, deve essere registrata e può essere utile per interpretare i risultati delle prove in relazione alle vie di esposizione. Informazioni supplementari sull'ingestione del sedimento possono essere ottenute utilizzando metodi descritti in (24), (25), (44), e (45), in cui si specifica l'ingestione di sedimento o la selezione di particelle negli organismi sperimentali.
27. Le procedure di manipolazione relative al sedimento naturale prima dell'uso in laboratorio sono descritte in (3), (7) e (12). La preparazione e la conservazione del sedimento artificiale raccomandato per l'uso nel *Lumbricus* è descritta nell'appendice 4.

Applicazione della sostanza chimica in esame

28. La sostanza chimica in esame è addizionata al sedimento. Poiché si prevede che la maggior parte delle sostanze chimiche in esame presenti una bassa idrosolubilità, tali sostanze vanno disciolte in un solvente organico idoneo (ad esempio acetone, n-esano, cicloesano) al volume più ridotto possibile per preparare la soluzione madre. La soluzione madre deve essere diluita con lo stesso solvente usato per le soluzioni di prova. La tossicità e la volatilità del solvente, nonché la solubilità della sostanza chimica in esame nel solvente prescelto devono costituire i criteri principali per la scelta dell'agente solubilizzante. Per ogni livello di concentrazione va usato lo stesso volume della soluzione corrispondente. Il sedimento deve essere addizionato cospargendo la sostanza chimica per ciascun livello di concentrazione al fine di ridurre al minimo la variabilità della concentrazione della sostanza chimica in esame tra le repliche. Ciascuna delle soluzioni di prova viene quindi mescolata con sabbia di quarzo come descritto nel paragrafo 22 (a titolo di esempio, 10 g di sabbia di quarzo per recipiente di prova). Per coprire completamente la sabbia di quarzo si è rivelato sufficiente un volume di 0,20-0,25 ml per g di sabbia. Successivamente, il solvente deve evaporare a secco. Al fine di ridurre al minimo le perdite della sostanza chimica in esame attraverso la co-evaporazione (ad es. in funzione della tensione di vapore della sostanza chimica in esame), la sabbia coperta va usata immediatamente dopo l'essiccazione. La sabbia secca viene mescolata con la quantità di sedimento artificiale prevista per il corrispondente livello di concentrazione. Occorre tener conto, al momento della preparazione del sedimento, della sabbia già contenuta nella miscela tra la sostanza chimica in esame e la sabbia (il sedimento, quindi, va preparato utilizzando meno sabbia). Questa procedura ha il grande vantaggio di non introdurre praticamente alcun solvente nel sedimento (7). In alternativa, quando si utilizza un sedimento naturale, la sostanza chimica in esame può essere addizionata a una porzione di terreno essiccato all'aria e finemente macinato come descritto in precedenza per la sabbia di quarzo, oppure mescolata insieme al sedimento umido, con una successiva fase di evaporazione se si utilizza un agente solubilizzante. Accertarsi che la sostanza chimica in esame aggiunta al sedimento sia perfettamente e omogeneamente distribuita al suo interno. Se necessario possono essere analizzati sottocampioni per verificare le concentrazioni bersaglio nel sedimento e per determinare il grado di omogeneità. Può essere inoltre utile analizzare sottocampioni delle soluzioni di prova al fine di confermare le concentrazioni bersaglio nel sedimento. Poiché si utilizza un solvente per depositare la sostanza chimica in esame sulla sabbia di quarzo, va impiegato un controllo con solvente preparato con la stessa quantità di solvente del sedimento di prova. Il metodo usato per l'addizione della sostanza chimica al sedimento e le ragioni per la scelta di una procedura di addizione specifica diversa da quella qui descritta devono essere riportati nella relazione. Il metodo di addizione può essere adattato alle proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica in esame, ad esempio per evitare le perdite dovute alla volatilizzazione durante l'addizione o l'equilibratura. Ulteriori orientamenti in materia di procedure di addizione sono forniti nel documento "Environment Canada" (1995) (46).

29. Una volta che il sedimento addizionato è stato preparato, ripartito nei recipienti di prova replicati e coperto con l'acqua di prova, è preferibile lasciare che la sostanza chimica in esame si ripartisca tra il sedimento e la fase acquosa (ad esempio (3) (7) (9)). Ciò dovrebbe avvenire, di preferenza, alle stesse condizioni di temperatura e aerazione utilizzate nella prova. Il tempo di equilibratura può durare alcune ore, dei giorni o, in rari casi, fino a diverse settimane (4-5 settimane), a seconda del sedimento e delle sostanze chimiche. (ad es. (27) (47)). In questa prova, l'equilibrio completo non è richiesto, ma si raccomanda un periodo di equilibratura da 48 ore a 7 giorni. Pertanto, il tempo di degradazione della sostanza chimica in esame sarà ridotto al minimo. In funzione della finalità dello studio, ad esempio se si tratta di simulare condizioni ambientali, il sedimento addizionato può essere equilibrato o lasciato "invecchiare" per un periodo più lungo.
30. Al termine di questo periodo di equilibratura, vanno prelevati dei campioni almeno dell'acqua sovrastante e nel sedimento cosparso, quantomeno alla concentrazione massima e a una concentrazione più bassa, ai fini dell'analisi della concentrazione della sostanza chimica in esame. Tali misurazioni analitiche della sostanza chimica in esame devono consentire di calcolare il bilancio di massa e di esprimere i risultati in funzione delle concentrazioni iniziali misurate. In linea di massima, il campionamento altera o distrugge il sistema idrico del sedimento. Pertanto, in genere non è possibile utilizzare le stesse repliche per il prelievo di campioni di sedimento e vermi. È necessario preparare recipienti "analitici" supplementari di dimensioni appropriate, sottoposti allo stesso trattamento (inclusa la presenza di organismi di prova), ma non utilizzati per le osservazioni biologiche. Le dimensioni dei recipienti scelti dovranno consentire di prelevare le quantità di campioni richieste dal metodo analitico. Informazioni dettagliate del campionamento sono riportate al paragrafo 53.

ESECUZIONE DELLA PROVA

Prova preliminare

31. Se non sono disponibili informazioni sulla tossicità della sostanza chimica in esame per il *Lumbriculus variegatus*, può essere utile condurre un esperimento preliminare allo scopo di determinare l'intervallo di concentrazioni da sottoporre a esame nella prova definitiva e di ottimizzarne le condizioni sperimentali. A tal fine si utilizza una serie di concentrazioni della sostanza chimica in esame molto intervallate tra loro. I vermi sono esposti ad ogni concentrazione della sostanza chimica in esame per un periodo (ad es. 28 giorni come nella prova vera e propria) per consentire di stimare le concentrazioni di prova adeguate; non è necessaria alcuna replica. Il comportamento dei vermi, ad esempio la tendenza ad evitare il sedimento, che potrebbe essere causata dalla sostanza chimica in esame e/o dal sedimento, va osservato e registrato nel corso di una prova preliminare. Concentrazioni superiori a 1 000 mg/kg del peso secco del sedimento non vanno sottoposte alla prova preliminare.

Prova definitiva

32. Nella prova definitiva è necessario usare e selezionare almeno cinque concentrazioni, ad esempio sulla base dei risultati della prova preliminare di determinazione dell'intervallo (paragrafo 31), e come descritto nei paragrafi 35, 36, 37 e 38.
33. Oltre alle serie di prove va previsto un controllo (per la replica cfr. i paragrafi 36, 37 e 38) contenente tutti i componenti tranne la sostanza chimica in esame. Se per applicare la sostanza chimica in esame è usato un agente solubilizzante, questo non deve avere effetti significativi sugli organismi sperimentali e ciò va dimostrato usando un controllo aggiuntivo contenente soltanto solvente.

Disegno sperimentale

34. Il disegno sperimentale comprende la selezione del numero delle concentrazioni della sostanza chimica in esame e dell'intervallo fra le stesse, il numero di recipienti per ciascun livello di concentrazione e il numero di vermi aggiunti per recipiente. Nei paragrafi 35, 36, 37 e 38 è descritto il procedimento da seguire per la stima puntuale della EC_x, la stima della NOEC e per l'esecuzione di una prova limite.
35. La concentrazione che determina un effetto (ad esempio e.g. EC₅₀ EC₂₅, EC₁₀) e l'intervallo delle concentrazioni alle quali la sostanza chimica in esame produce un effetto d'interesse devono rientrare tra le concentrazioni incluse nella prova. Bisogna evitare di estrapolare risultati molto al di sotto della concentrazione più debole che produce un effetto sugli organismi sperimentali o al di sopra della concentrazione massima prevista dalla prova. Se, in casi eccezionali, si procede a una tale estrapolazione, è necessario fornire una spiegazione esauriente nella relazione.

36. Se deve essere stimato l' EC_x , vanno sottoposte a prova almeno cinque concentrazioni con un minimo di tre repliche per ciascuna concentrazione; si raccomandano sei repliche per il controllo o, se utilizzato, il controllo con solvente, al fine di migliorare la stima della variabilità dei diversi gruppi di controllo. In ogni caso, per ottenere una buona stima del modello è consigliabile utilizzare un numero sufficiente di concentrazioni. Il fattore tra una concentrazione e l'altra non deve essere maggiore di due (salvo nel caso in cui la curva di risposta in funzione della concentrazione sia poco accentuata). Il numero di repliche per trattamento può essere diminuito se si aumenta il numero di concentrazioni che danno risposte nel range 5– 95 %. L'aumento del numero di repliche o la riduzione degli intervalli delle concentrazioni tendono a ridurre gli intervalli di confidenza per la prova.
37. Se devono essere stimati i valori LOEC/NOEC, si raccomandano almeno cinque concentrazioni di prova con almeno quattro repliche (si raccomandano sei repliche per il controllo o, se utilizzato, il controllo con solvente, al fine di migliorare la stima della variabilità dei diversi gruppi di controllo) e il fattore tra le concentrazioni non deve essere superiore a due. Alcune informazioni sulla potenza statistica riscontrata durante la verifica di ipotesi nella prova interlaboratorio del metodo di prova figurano nell'appendice 6.
38. Si può condurre una prova limite (usando una concentrazione di prova e controlli) se non sono previsti effetti fino a 1 000 mg/kg di peso secco del sedimento, (ad es. in base a una prova preliminare di determinazione dell'intervallo) oppure se la prova a una singola concentrazione è inadeguata per confermare un valore NOEC di interesse. In quest'ultimo caso è necessario riportare nella relazione di prova una motivazione dettagliata della scelta dei limiti di concentrazione. Lo scopo della prova limite è quello di testare una concentrazione sufficientemente alta da consentire a chi di competenza di escludere eventuali effetti tossici della sostanza chimica in esame; il limite va fissato a una concentrazione la cui comparsa è improbabile in tutte le situazioni. Si raccomanda un rapporto di 1 000 mg/kg (peso secco). Di norma è necessario allestire sei repliche sia per gli organismi trattati che per i controlli. Alcune informazioni sulla potenza statistica riscontrata durante la verifica di ipotesi nella prova interlaboratorio del metodo di prova figurano nell'appendice 6.

Condizioni di esposizione

Organismi sperimentali

39. La prova è eseguita con almeno 10 vermi per ogni replica utilizzata per la determinazione di parametri biologici. Questo numero di vermi corrisponde a circa 50-100 mg di biomassa fresca. Ipotizzando un tenore di materia secca pari al 17,1 % (48), ciò si traduce in circa 9-17 mg di biomassa secca per recipiente. U.S. EPA (2000 (7)) raccomanda di utilizzare un tasso di carico inferiore o uguale a 1: 50 (biomassa secca: TOC). Per il sedimento artificiale descritto al paragrafo 22, ciò corrisponde a circa 43 g (peso secco) di sedimento per 10 vermi ad un tenore TOC del 2,0 % del sedimento secco. Nei casi in cui si utilizzano più di 10 vermi per recipiente, la quantità di sedimento e acqua sovrastante deve essere adeguata di conseguenza.
40. Tutti i vermi impiegati nella stessa prova devono avere la stessa origine e presentare uno stato fisiologico simile (cfr. appendice 5). Vanno selezionati vermi di dimensioni simili (cfr. paragrafo 39). Si raccomanda di pesare un sottocampione del lotto o dello stock di vermi prima della prova per stimare il peso medio.
41. Gli animali utilizzati nella prova sono prelevati dal terreno di allevamento (cfr. appendice 5 per ulteriori particolari). Gli animali grandi (adulti) che non presentano segni di frammentazione recente sono trasferiti in piastre di vetro (ad esempio, capsula Petri) contenenti acqua pulita. Essi vengono successivamente sincronizzati come descritto nell'appendice 5. Dopo un periodo di rigenerazione da 10 a 14 giorni, vanno usati per la prova i vermi completi e intatti di dimensioni simili, che nuotano attivamente o si muovono dopo un leggero stimolo meccanico. Se le condizioni sperimentali sono diverse dalle condizioni di allevamento (ad esempio in termini di regime di temperatura, luce e acqua sovrastante), una fase di acclimatazione, ad es. di 24 ore, alla stessa temperatura e luce e con la medesima acqua sovrastante della prova dovrebbe essere sufficiente affinché gli animali si adattino alle condizioni sperimentali. Gli oligocheti adeguati a tali condizioni devono essere ripartiti a caso nei recipienti di prova.

Alimentazione

42. Dal momento che il cibo è aggiunto al sedimento prima (o durante) l'applicazione della sostanza chimica in esame, gli animali non sono più alimentati durante la prova.

Illuminazione e temperatura

43. Il fotoperiodo applicato durante l'allevamento e la prova di norma dura 16 ore (3), (7). L'intensità luminosa va mantenuta a un livello basso (ad esempio, 100-500 lux) per limitare le condizioni naturali alla superficie del sedimento, e va misurata almeno una volta nel corso del periodo di esposizione. La temperatura deve essere di $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per tutta la durata della prova. In una determinata data di misurazione la differenza di temperatura tra i recipienti di prova non deve essere superiore a $\pm 1^{\circ}\text{C}$. I recipienti di prova devono essere collocati nell'incubatore di prova o nell'area di prova in modo casuale, ad esempio per ridurre al minimo gli errori sistematici di riproduzione a causa dell'ubicazione del recipiente.

Aerazione

44. L'acqua sovrastante dei recipienti deve essere leggermente aerata (ad esempio 2-4 bolle al secondo) per mezzo di una pipetta Pasteur posizionata a circa 2 cm sopra la superficie del sedimento in modo da ridurre al minimo l'alterazione del sedimento. È necessario accertarsi che la concentrazione di ossigeno dissolto non scenda al di sotto del 30 % del valore di saturazione in aria (ASV). L'apporto di aria va tenuto sotto controllo e, se necessario, adeguato almeno una volta al giorno nei giorni lavorativi.

Misurazione della qualità dell'acqua

45. I seguenti parametri di qualità dell'acqua devono essere misurati nell'acqua sovrastante:

Temperatura:	almeno in un recipiente di prova per ciascun livello di concentrazione e in un recipiente di prova per i controlli una volta a settimana nonché all'inizio e alla fine del periodo di esposizione; se possibile, può essere registrata anche la temperatura nell'elemento circostante (ambiente o bagno d'acqua), ad esempio a cadenza oraria;
Tenore di ossigeno dissolto:	almeno in un recipiente di prova per ciascun livello di concentrazione e in un recipiente di prova per i campioni di controllo una volta a settimana nonché all'inizio e alla fine del periodo di esposizione; valore espresso in mg/l e % ASV (valore di saturazione in aria);
Alimentazione dell'aria:	deve essere controllata almeno una volta al giorno nei giorni lavorativi e se necessario adeguata;
pH:	almeno in un recipiente di prova per ciascun livello di concentrazione e in un recipiente di prova per i controlli una volta a settimana nonché all'inizio e alla fine del periodo di esposizione;
Durezza totale dell'acqua:	almeno in una replica dei controlli e in un recipiente al livello di concentrazione più elevato all'inizio e alla fine del periodo di esposizione; valore espresso in mg/l CaCO ₃ ;
Tenore totale di ammoniaca:	almeno in una replica dei controlli e in un recipiente per tutti i livelli di concentrazione all'inizio e alla fine del periodo di esposizione e successivamente 3 volte a settimana; valore espresso in mg/l NH ₄ ⁺ oppure NH ₃ o azoto ammoniacale totale.

Se la misurazione dei parametri di qualità dell'acqua richiede l'eliminazione di una quantità significativa di campioni di acqua dai recipienti, può essere opportuno separare i recipienti per le misurazioni della qualità dell'acqua per non modificare il rapporto volumico acqua-sedimento.

Osservazioni biologiche

46. Durante l'esposizione, i recipienti vanno osservati al fine di valutare le differenze visibili nel comportamento dei vermi (ad esempio, la tendenza ad evitare il sedimento, la presenza di grumi fecali sulla superficie del sedimento) rispetto ai controlli. Le osservazioni vanno registrate.

47. Alla fine della prova, viene esaminata ogni replica (i recipienti supplementari destinati alle analisi chimiche possono essere esclusi dall'esame). Va usato un metodo adeguato per recuperare tutti i vermi dal recipiente. È necessario accertarsi che tutti i vermi siano recuperati illesi. Un metodo possibile è la setacciatura degli animali nel sedimento. Può essere usato un setaccio in acciaio di dimensione adeguata. La maggior parte dell'acqua sovrastante va fatta decantare con cura e il sedimento e l'acqua restanti vanno agitati al fine di creare una sospensione fangosa che può essere fatta passare attraverso il setaccio. Usando un setaccio di 500 µm, la maggior parte delle particelle di sedimento passerà molto rapidamente tra le maglie del setaccio; tuttavia la setacciatura va eseguita rapidamente al fine di evitare che i vermi si attacchino alle maglie o passino tra le stesse. Usando un setaccio di 250 µm i vermi non si attacheranno alla maglia del setaccio o non passeranno tra le maglie; in questo è tuttavia necessario fare in modo che la trama trattenga il meno possibile le particelle di sedimento. Le sospensioni fangose di ciascun recipiente di replica possono essere passate al setaccio una seconda volta al fine di garantire che tutti i vermi siano recuperati. In alternativa si potrebbe usare il seguente metodo: scaldare il sedimento ponendo i recipienti di prova a bagnomaria a 50-60 °C; i vermi si staccheranno dal sedimento e potranno essere raccolti sulla superficie del sedimento con una pipetta ad apertura larga lucidata a fuoco. Un altro metodo alternativo potrebbe essere quello di produrre una sospensione fangosa che sarà sparsa su una vaschetta poco profonda di adeguate dimensioni. I vermi possono essere raccolti nello strato sottile di sospensione fangosa con un ago in acciaio o con una pinzetta da orologeria (da utilizzare come una forchetta piuttosto che come una pinza per evitare di ferire i vermi) e trasferiti in acqua pulita. Dopo la separazione dei vermi dalla sospensione fangosa di sedimento, questi vanno sciacquati nel mezzo di prova e contati.
48. Indipendentemente dal metodo utilizzato, i laboratori devono dimostrare che il loro personale è in grado di recuperare dal sedimento una media di almeno il 90 % degli organismi. Ad esempio, un certo numero di organismi sperimentali potrebbe essere aggiunto al sedimento di controllo o al sedimento delle prove e il loro recupero può essere previsto dopo 1 h (7).
49. Il numero totale di esemplari vivi e morti per replica va registrato e valutato. I seguenti gruppi di vermi sono considerati morti:
- non vi è alcuna reazione dopo un leggero stimolo meccanico;
 - vi sono segni di decomposizione (in combinazione con la lettera a));
 - manca un certo numero di vermi.
- Inoltre, i vermi in vita possono essere attribuiti a uno dei tre gruppi:
- vermi completi di dimensioni grandi (adulti) senza regioni corporee rigenerate;
 - vermi completi con regioni corporee rigenerate e dal colore più chiaro (ad esempio dotati di una nuova parte posteriore, di una nuova parte posteriore o di entrambe le parti, anteriore e posteriore, nuove);
 - vermi incompleti (ad esempio, vermi frammentati di recente con regioni corporee non rigenerate).
- Tali osservazioni complementari non sono obbligatorie, ma possono essere utilizzate a titolo di interpretazione supplementare dei risultati biologici (ad esempio, un elevato numero di vermi assegnati al gruppo c) può indicare un ritardo di riproduzione o rigenerazione in un determinato trattamento). Inoltre, se tra vermi trattati e di controllo, si osservano differenze di aspetto (ad esempio lesioni del tegumento, sezioni corporee edematose), queste vanno registrate.
50. Immediatamente dopo essere state contate/esaminate, i vermi vivi trovati in ciascuna replica sono trasferiti in piatti di bilancia asciutti, tarati ed etichettati (uno per replica) e soppressi con una goccia di etanolo per piatto di bilancia. I piatti di bilancia sono posizionati in un forno di essiccamiento a 100 ± 5 °C al fine di essere essiccati nel corso della notte. In seguito sono raffreddati in un essiccatore e successivamente pesati, per determinare il peso secco (preferibilmente in g con almeno 4 cifre decimali).
51. Oltre al peso totale secco, il peso secco esente da ceneri può essere determinato come descritto in (49), al fine di tenere conto dei componenti anorganici provenienti dal sedimento ingerito presente nell'apparato digerente dei vermi.
52. La biomassa è determinata come biomassa totale per replica comprensiva dei vermi adulti e giovani. I vermi morti non sono tenuti in considerazione nella determinazione della biomassa per replica.

Verifiche delle concentrazioni delle sostanze chimiche in esame

Campionamento

53. I campioni per procedere all'analisi chimica della sostanza chimica in esame devono essere prelevati almeno alla concentrazione massima e a una più bassa, almeno alla fine della fase di equilibratura (prima di introdurre gli organismi sperimentali), e al termine della prova. Devono essere campionati per l'analisi almeno il sedimento e l'acqua sovrastante. Per ogni matrice e trattamento a ciascuna data di campionamento vanno prelevati almeno due campioni. Uno dei due campioni può essere conservato come riserva (da analizzare, ad esempio, nel caso in cui una prima analisi si situai al di fuori dell'intervallo di $\pm 20\%$ della concentrazione nominale). In caso di specifiche proprietà chimiche, ad esempio se si prevede una rapida degradazione della sostanza chimica in esame, la tempistica delle analisi può essere adeguata (ad esempio una maggiore frequenza di campionamento, un'analisi di più livelli di concentrazione) sulla base del parere di esperti. In questo caso i campioni possono essere prelevati in date di campionamento intermedie (ad esempio al settimo giorno dopo l'inizio dell'esposizione).
54. L'acqua sovrastante deve essere raccolta con cura facendo decantare o sifonare l'acqua sovrastante, in modo da ridurre al minimo l'alterazione del sedimento. Prendere nota del volume dei campioni prelevati.
55. In seguito alla rimozione dell'acqua sovrastante, il sedimento va omogeneizzato e trasferito in un contenitore appropriato. In seguito si registra il peso del campione di sedimento umido.
56. Se è richiesta anche l'analisi della sostanza chimica in esame nell'acqua interstiziale, i campioni di sedimento omogeneizzati e pesati vanno centrifugati per ottenere l'acqua interstiziale. Ad esempio, circa 200 ml di sedimento umido possono essere versati in becher di centrifugazione da 250 ml. In seguito i campioni vanno centrifugati senza filtrazione per isolare l'acqua interstiziale, ad esempio a $10\,000 \pm 600 \times g$ per 30-60 minuti a una temperatura non superiore alla temperatura utilizzata per la prova. Dopo la centrifugazione si decanta o preleva con una pipetta il surnatante avendo cura che non vengano introdotte particelle di sedimento e si registra il volume. Il peso del pellet di sedimento rimanente viene registrato. Ciò può semplificare la stima del bilancio di massa o del recupero della sostanza chimica in esame nel sistema acqua-sedimento nel caso in cui il peso secco del sedimento sia determinato in ciascuna data di campionamento. In alcuni casi, se i campioni sono troppo piccoli, può rivelarsi impossibile analizzare le concentrazioni nell'acqua interstiziale.
57. In mancanza di un'analisi immediata, tutti i campioni vanno conservati con un metodo appropriato, ad esempio seguendo le condizioni di conservazione raccomandate per limitare quando più possibile la degradazione della sostanza chimica in esame (ad esempio, i campioni ambientali sono comunemente conservati a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ al buio). È necessario ottenere informazioni sulle corrette modalità di conservazione per la specifica sostanza chimica in esame, ad esempio la durata e la temperatura di conservazione, le procedure di estrazione, ecc., prima dell'inizio dello studio.

Metodo di analisi

58. Poiché tutta la procedura è basata sostanzialmente sull'accuratezza, la precisione e la sensibilità del metodo analitico utilizzato per la sostanza chimica in esame, controllare sperimentalmente che la precisione e la riproducibilità dell'analisi chimica, nonché il recupero della sostanza chimica in esame dall'acqua e dai campioni di sedimento, siano soddisfacenti per quel particolare metodo quantomeno alla concentrazione più bassa e più alta della prova. È inoltre necessario verificare che la sostanza chimica in esame non sia rilevabile nei recipienti di controllo in concentrazioni superiori al limite di quantificazione. Se necessario, si procede alla correzione delle concentrazioni nominali per tenere conto dei recuperi delle addizioni dei controlli di qualità (ad esempio, quando il recupero è al di fuori del range dell'80-120 % della quantità addizionata). Per l'intera durata della prova tutti i campioni devono essere manipolati in modo da ridurre al minimo la contaminazione e le perdite (derivanti, ad esempio, dall'adsorbimento della sostanza chimica in esame sul dispositivo di campionamento).
59. Vanno registrati e rendicontati il recupero della sostanza chimica in esame, il limite di quantificazione e il limite di rilevazione nel sedimento e nell'acqua.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

60. Le principali variabili di risposta della prova che devono essere valutate tassativamente dal punto di vista statistico sono la biomassa e il numero totale di vermi per replica. È inoltre possibile valutare anche la riproduzione (come aumento del numero dei vermi) e la crescita (come aumento della biomassa secca). In questo caso si può ottenere una stima del peso secco dei vermi all'inizio dell'esposizione, ad esempio mediante misurazione del peso secco di un sottocampione rappresentativo del lotto di vermi sincronizzati da utilizzare per la prova.

61. Sebbene la mortalità non sia un endpoint di questa prova, nei limiti del possibile le mortalità vanno valutate. Al fine di stimare le mortalità, il numero di vermi che non reagiscono ad un leggero stimolo meccanico o hanno evidenziato segni di decomposizione nonché i vermi mancanti devono essere considerati morti. Le mortalità vanno almeno registrate e tenute in considerazione nell'interpretazione dei risultati delle prove.
62. Le concentrazioni che determinano un effetto devono essere espresse in mg/kg del peso secco del sedimento. Se il recupero della sostanza chimica in esame misurata all'inizio dell'esposizione nel sedimento o nel sedimento e nell'acqua sovrastante è compreso in un intervallo tra l'80 % e il 120 % delle concentrazioni nominali, le concentrazioni che determinano un effetto (EC_x , NOEC, LOEC) possono essere espresse sulla base di concentrazioni nominali. Se il recupero si discosta dalle concentrazioni nominali di oltre $\pm 20\%$ delle stesse, le concentrazioni che determinano un effetto (EC_x , NOEC, LOEC) devono basarsi sulle concentrazioni iniziali misurate al principio dell'esposizione, ad esempio tenendo conto dell'equilibrio di massa della sostanza chimica in esame nel sistema di prova (cfr. paragrafo 30). In questi casi, dall'analisi delle soluzioni madre e/o delle soluzioni di applicazione possono essere ottenute informazioni supplementari al fine di confermare che il sedimento sperimentale sia stato preparato correttamente.

EC_x

63. I valori EC_x per i parametri descritti al paragrafo 60 sono calcolati usando metodi statistici appropriati (ad esempio analisi Probit, funzione logistica o di Weibull, il metodo Trimmed Spearman-Karber o la semplice interpolazione). I riferimenti (15) e (50) forniscono orientamenti sulla valutazione statistica. Una EC_x è ottenuta inserendo nell'equazione un valore corrispondente ad $x\%$ della media del controllo. Ai fini del calcolo dell' EC_{50} o di ogni altro valore EC_x , le medie per trattamento (\bar{X}) vanno sottoposte ad analisi di regressione.

NOEC/LOEC

64. Se l'analisi statistica mira a determinare la NOEC/LOEC, sono necessarie statistiche per recipiente (i recipienti individuali sono considerati repliche). Si deve ricorrere a metodi statistici appropriati. In generale, gli effetti negativi della sostanza chimica in esame rispetto al controllo sono analizzati con verifica di ipotesi unilaterale (più debole) a $p \leq 0,05$. Gli esempi sono riportati nei paragrafi che seguono. Ai paragrafi (15) e (50) sono forniti orientamenti sui metodi statistici appropriati.
65. La distribuzione normale dei dati può essere sottoposta a prova, ad esempio con il test Kolmogorov-Smirnov per la bontà dell'adattamento, il test del rapporto tra intervallo e deviazione standard (test R/s) o il test Shapiro-Wilk (bilaterale, $p \leq 0,05$). Per esaminare l'omogeneità delle varianze è possibile usare il test di Cochran, il test di Levene o i test di Bartlett (bilaterale, $p \leq 0,05$). Se sono soddisfatti i prerequisiti dei protocolli dei test parametrici (normalità e omogeneità della varianza), possono essere svolti sia analisi della varianza a un fattore, sia successivi test multi-confronto. Per verificare eventuali differenze significative ($p \leq 0,05$) tra i campioni di controllo e le varie concentrazioni della sostanza chimica in esame si può procedere a calcoli basati su confronti a coppie (ad esempio, il test di Dunnnett a una coda) o test di tendenza regressivi (ad esempio il test di Williams). In caso contrario vanno usati metodi non parametrici (ad esempio il test U di Bonferroni secondo Holm o il test di tendenza Jonckheere-Terpstra) per determinare la LOEC e la NOEC.

Prova limite

66. Se è stata effettuata una prova limite (confronto tra un controllo e un solo trattamento) e i prerequisiti dei test parametrici (normalità, omogeneità) sono soddisfatti, le risposte metriche (numero complessivo di vermi e biomassa come peso secco dei vermi) possono essere valutate con il test t di Student. In caso contrario, si può ricorrere al test t per varianze disuguali (t test di Welch) o a un test non parametrico, come il test U di Wilcoxon-Mann-Whitney. Alcune informazioni sulla potenza statistica riscontrata durante la verifica di ipotesi nella prova interlaboratorio del metodo figurano nell'appendice 6.
67. Per determinare le differenze significative tra i controlli (campione di controllo e controllo con solvente), le repliche di ogni controllo possono essere sottoposte a prove come descritto per la prova limite. Se tali prove non rilevano differenze significative, tutte le repliche del controllo e del controllo con solvente possono essere raggruppate. Altrimenti tutti i trattamenti devono essere confrontati con quello del controllo con solvente.

Interpretazione dei risultati

68. In caso di deviazioni dal presente metodo di prova e in caso di concentrazioni sperimentali misurate prossime al limite di rivelazione del metodo analitico, i risultati devono essere interpretati con cautela. Le eventuali deviazioni dal presente metodo di prova devono essere registrate.

Relazione sulla prova

69. La relazione sulla prova comprende almeno le informazioni seguenti:

- *Sostanza chimica in esame*:
 - identificazione chimica (nome comune, nome chimico, formula strutturale, numero CAS, ecc.), purezza e metodo di analisi per la quantificazione della sostanza chimica in esame; fonte della sostanza chimica in esame, identità e concentrazione di eventuali solventi utilizzati;
 - tutte le informazioni disponibili sulla natura fisica e sulle proprietà fisico-chimiche ottenute prima dell'inizio della prova (ad esempio, idrosolubilità, tensione di vapore, coefficiente di ripartizione nel terreno (o nel sedimento, se del caso), $\log K_{ow}$, stabilità nell'acqua, ecc.);
- *Specie sperimentali*:
 - nome scientifico, ceppo, provenienza, eventuali pretrattamenti, acclimatazione, condizioni di allevamento, ecc.
- *Condizioni di prova*:
 - procedimento sperimentale usato (ad es. statico, semi-statico o a flusso continuo);
 - disegno sperimentale (ad es. numero, materiale e dimensioni dei recipienti di prova, volume dell'acqua per recipiente, massa e volume sedimentale per recipiente (per procedimenti a flusso continuo o semi-statici: tasso di sostituzione del volume di acqua), eventuale aerazione avvenuta prima e durante la prova, numero di repliche, numero di vermi per replica all'inizio dell'esposizione, numero di concentrazioni di prova, durata dei periodi di condizionamento, equilibratura ed esposizione, frequenza dei campionamenti);
 - spessore del sedimento e profondità dell'acqua sovrastante;
 - metodo di pretrattamento e di addizione/applicazione della sostanza chimica in esame;
 - concentrazioni nominali di prova, dettagli sul campionamento per l'analisi chimica e metodi analitici con cui sono state ottenute le concentrazioni della sostanza chimica in esame;
 - caratteristiche del sedimento come descritte ai paragrafi 24-25 ed eventuali altre misurazioni effettuate; preparazione di sedimento artificiale;
 - preparazione dell'acqua di prova (se si utilizza acqua artificiale) e caratteristiche (concentrazione di ossigeno, pH, conduttività, durezza ed eventuali altre misurazioni effettuate) prima dell'inizio della prova,
 - informazioni dettagliate sull'alimentazione, che comprendano il tipo di mangime, la preparazione, la quantità e il regime di alimentazione;
 - intensità luminosa e fotoperiodo/i;
 - metodi utilizzati per la determinazione di tutti i parametri biologici (ad esempio campionamento, ispezione, pesatura degli organismi sperimentali) e tutti i parametri abiotici (ad esempio parametri di qualità dell'acqua e del sedimento);
 - volumi e/o il peso di tutti i campioni per l'analisi chimica;
 - informazioni particolareggiate sul trattamento dei campioni per l'analisi chimica, ivi compresi i dettagli su preparazione, conservazione, procedure di addizione, estrazione e procedure analitiche (e loro precisione) per la sostanza chimica in esame, oltre ai recuperi della sostanza chimica in esame.

— Risultati:

- qualità dell'acqua nei recipienti di prova (pH, temperatura, concentrazione di ossigeno dissolto, durezza, concentrazioni di ammoniaca ed eventuali altre misurazioni effettuate);
- tenore di carbonio organico totale (TOC), rapporto peso secco/peso umido, pH del sedimento ed eventuali altre misurazioni effettuate;
- numero totale e, se determinato, numero di vermi completi e incompleti in ciascun contenitore di prova alla fine della prova;
- peso secco dei vermi di ciascun contenitore di prova alla fine della prova e, se misurato, peso secco di un sottocampione dei vermi all'inizio della prova;
- ogni comportamento anomalo rilevato rispetto ai controlli (ad esempio, tendenza ad evitare il sedimento, presenza o assenza di grumi fecali);
- eventuali casi di mortalità osservati;
- stime degli endpoint di tossicità (ad es. EC_x, NOEC e/o LOEC) nonché metodi statistici utilizzati per determinarli;
- concentrazioni nominali sperimentali, concentrazioni sperimentali misurate e risultati di tutte le analisi condotte per determinare la concentrazione della sostanza chimica in esame nei recipienti di prova,
- eventuali deviazioni dai criteri di validità.

— Valutazione dei risultati:

- conformità dei risultati ai criteri di validità di cui al paragrafo 13,
- discussione dei risultati, comprese le eventuali ripercussioni sui risultati dovute allo scostamento dal presente metodo di prova.

BIBLIOGRAFIA

- (1) EC (2003). Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I — IV. Office for Official Publications of the EC (European Commission), Luxembourg.
- (2) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.
- (3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ. Toxicol. Chem. 12, 269-279.
- (6) Capitolo C.27 del presente allegato, "Prova di tossicità su chironomide in acqua-sedimento con sedimenti addizionato".
- (7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

- (8) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.
- (9) Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (eds), 1993, Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8-10 November 1993, Renesse (NL).
- (10) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Strelake and H.Köpp. Berlin 1995.
- (11) Riedhammer C. & B. Schwarz-Schulz (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105-110.
- (12) ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.
- (13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (15) Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; fifth draft, March 2003; Report EPS 1/RM/____
- (16) Nikkilä A., Halme A., Kukkonen J.V.K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35-46.
- (17) Baily H.C., & Liu D.H.W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. p. 205-215. In J.C. Eaton, P.R. Parrish, and A.C. Hendricks (eds). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.
- (18) Chapman K. K., Benton M. J., Brinkhurst R. O. & Scheuerman P. R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. Environmental Toxicology. 14(2): 271-278.
- (19) Meyer J.S., Boese C.J. & Collyard S.A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. Comp. Biochem. Physiol. Part C 133:99-109.
- (20) Schubauer-Berigan M.K., Dierkes J.R., Monson P.D. & Ankley G.T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxciol. Chem. 12(7):1261-1266.
- (21) West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps & G.T. Ankley (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. Hydrobiol. 262:57-63.
- (22) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.
- (23) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.
- (24) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

- (25) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (26) Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg, M.S., & Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 292-302.
- (27) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
- (28) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty, J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 872-885.
- (29) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): *Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality*. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., & Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of ^{14}C -17 α -ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. *Chemosphere* 59, 271-280.
- (31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Environ. Toxicol. Chemistry*, Vol. 20, pp. 2000–2007.
- (32) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.
- (33) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Hung. Toxicol.* 32, 1503-1508.
- (34) Dermott R. & Munawar M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 235/236: 407-414.
- (35) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. *Develop. Biol.* 138: 94-103.
- (36) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. *Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ.* No. 22.
- (37) Chapter C.1 of this Annex, Fish, Acute Toxicity Test.
- (38) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.
- (39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. *Chemosphere* 35, 835-852.
- (40) Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel and B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety*, 39, 10-20.
- (41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on "Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes", 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- (42) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1163-1175.
- (43) Naylor, C. and C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. *Chemosphere* 31: 3291-3303.
- (44) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezosi, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. *Hydrobiologia* 11, 181-184.

- (45) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.
- (46) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.
- (47) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Hung. Technol. 23, 588-595.
- (48) Brooke, L.T., Ankley, G.T., Call, D.J. & Cook, P.M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. Environ. Toxicol. Chem. 15, 223-228.
- (49) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.
- (50) OECD 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OECD, Paris, France.
- (51) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

Ulteriore letteratura sulle procedure statistiche:

Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Soc. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Hung. Technol. 11(7), 714-719; Correction: Environ. Hung. Technol. 12 (1998), 417.

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

Miller, R.G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. ed. John Wiley & Sons. New York.

Shapiro S.S. & Wilk M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591-611.

Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

Appendice 1

Definizioni

Ai fini del presente metodo di prova si applicano le seguenti definizioni:

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

Periodo di condizionamento: periodo che serve a stabilizzare la flora microbica del sedimento e a rimuovere, ad esempio, l'ammoniaca che si forma nei componenti del sedimento; il periodo ha luogo prima dell'addizione della sostanza chimica al sedimento. Di norma, l'acqua sovrastante viene scartata dopo il condizionamento.

EC_x: concentrazione della sostanza chimica in esame nel sedimento che causa un effetto dell'x % (ad esempio del 50 %) su un parametro biologico entro un periodo di esposizione specificato.

Periodo di equilibratura: serve per consentire alla sostanza chimica di ripartirsi tra la fase solida, l'acqua interstiziale e l'acqua sovrastante; il periodo ha luogo dopo l'addizione della sostanza chimica al sedimento e prima dell'aggiunta degli organismi sperimentali.

Fase di esposizione: tempo durante il quale gli organismi sperimentali sono esposti alla sostanza chimica in esame.

Sedimento artificiale, sintetico o formulato: miscela di materiali usati per simulare i componenti fisici di un sedimento naturale.

LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration* — Concentrazione minima a cui si osserva un effetto statisticamente significativo): è la più bassa concentrazione saggia di una sostanza chimica in esame alla quale si osserva un effetto significativo ($p < 0,05$) rispetto al controllo. Tutte le concentrazioni superiori alla LOEC, tuttavia, devono avere un effetto uguale o superiore a quello osservato per la LOEC. Se queste due condizioni non possono essere soddisfatte occorre fornire una spiegazione dettagliata per spiegare come è stata scelta la LOEC (e pertanto la NOEC).

NOEC (*No Observed Effect Concentration*, NOEC — Massima concentrazione senza effetti significativi): concentrazione di prova immediatamente inferiore alla LOEC che, se confrontata con il controllo, non ha un effetto statisticamente significativo ($p < 0,05$), entro un periodo di esposizione definito.

Coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (K_{ow}): rapporto tra la solubilità di una sostanza chimica in n-ottanolo e quella in acqua all'equilibrio; rappresenta la lipofilia di una sostanza chimica (capitolo A.24 del presente allegato). K_{ow} o il logaritmo di K_{ow} ($\log K_{ow}$) viene usato come indicazione del potenziale di bioaccumulo di una sostanza chimica da parte di organismi acquatici.

Coefficiente di ripartizione carbonio organico-acqua (K_{oc}): rapporto tra la concentrazione di una sostanza chimica nella o sulla frazione di carbonio organico di un sedimento e la concentrazione della sostanza chimica all'equilibrio.

Acqua sovrastante: l'acqua che copre il sedimento nel recipiente di prova.

Acqua interstiziale: l'acqua che occupa lo spazio tra il sedimento o le particelle di terreno.

Sedimento addizionato: sedimento al quale è stata aggiunta la sostanza chimica in esame.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela saggia seguendo il presente metodo di prova.

Appendice 2

Composizione dell'acqua artificiale raccomandata

(adozione in base al capitolo C.1 del presente allegato (1)).

(a) *Soluzione di cloruro di calcio*

Dissolvere 11,76 g di $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in acqua deionizzata; portare a 1 l con acqua deionizzata.

(b) *Soluzione di sulfato di magnesio*

Dissolvere 4,93 g di $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in acqua deionizzata; portare a 1 l con acqua deionizzata.

(c) *Soluzione di carbonato di sodio*

Dissolvere 2,59 g di $\text{MgSO}_3 \times 7\text{H}_2\text{O}$ in acqua deionizzata; portare a 1 l con acqua deionizzata.

(d) *Soluzione di cloruro di potassio*

Dissolvere 0,23 g KCl in acqua deionizzata; portare a 1 l con acqua deionizzata.

Tutte le sostanze chimiche devono avere purezza analitica.

La conduttività dell'acqua distillata o deionizzata non può superare $10 \mu\text{Scm}^{-1}$.

25 ml di ciascuna soluzione da (a) a (d) sono miscelati e il volume totale è portato a 1 l con acqua deionizzata. La somma degli ioni di calcio e magnesio in queste soluzioni è di 2,5 mmol/l.

Il rapporto degli ioni Ca e Mg è 4:1 e quello degli ioni Na e K è di 10:1. La capacità acida $K_{S4,3}$ della presente soluzione è 0,8 mmol/l.

Aerare l'acqua di diluizione fino a quando non si raggiunge la saturazione dell'ossigeno, in seguito conservarla per circa due giorni senza ulteriore aerazione prima dell'uso.

RIFERIMENTI

- (1) Capitolo C.1 del presente allegato, "Tossicità acuta per i pesci".

Appendice 3**Caratteristiche fisico-chimiche di un'acqua di diluizione accettabile**

Componente	Concentrazioni
Particolato	< 20 mg/l
Carbonio organico totale	< 2 µg/l
Ammoniaca non ionizzata	< 1 µg/l
Cloro residuo	< 10 µg/l
Pesticidi organofosforati totali	< 50 ng/l
Pesticidi organoclorurati totali più difenili policlorurati	< 50 ng/l
Cloro organico totale	< 25 ng/l

(adottato in base ad OCSE (1992) (1))

RIFERIMENTI

- (1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

Appendice 4

Orientamenti per la preparazione e conservazione sul sedimento artificiale raccomandato**Componenti del sedimento**

Componente	Caratteristiche	% del sedimento peso secco
Torba	Torba di sfagno, livello di decomposizione: "medio", essiccati all'aria, priva di residui visibili di piante, finemente macinata (dimensioni delle particelle $\leq 0,5$ mm)	$5 \pm 0,5$
Sabbia di quarzo	Granulometria: ≤ 2 mm, ma > 50 % delle particelle ha dimensioni comprese tra 50 e 200 μm	75 - 76
Argilla caolinica	Tenore di caolinite ≥ 30 %	20 ± 1
Fonte alimentare.	ad es. polveri di foglie di ortica (<i>Folia urticae</i>), foglie di <i>Urtica dioica</i> , finemente macinate (dimensione delle particelle $\leq 0,5$ mm); conforme alle norme farmaceutiche, per il consumo umano; in aggiunta al sedimento secco	0,4 - 0,5 %
Carbonio organico	Regolato aggiungendo torba e sabbia	$2 \pm 0,5$
Carbonato di calcio	CaCO_3 , in polvere, chimicamente puro, in aggiunta al sedimento secco	0,05 - 1
Acqua deionizzata	Conduttività $\leq 10 \mu\text{S}/\text{cm}$, in aggiunta al sedimento secco	30 - 50

Nota: Se sono previste elevate concentrazioni di ammoniaca, ad esempio se è noto che la sostanza chimica in esame inibisce la nitrificazione, può essere utile sostituire il 50 % della polvere di ortiche ricca di azoto con cellulosa (ad esempio, polvere di alfa-cellulosa, chimicamente pura, con dimensione delle particelle $\leq 0,5$ mm; (1) (2)).

Preparazione

Far essiccare all'aria e macinare finemente la torba. Preparare una sospensione della quantità richiesta di polvere di torba in acqua deionizzata utilizzando un omogeneizzatore ad alte prestazioni. Regolare il pH della sospensione a $5,5 \pm 0,5$ con CaCO_3 . Tenere per almeno due giorni la sospensione a temperatura di 20 ± 2 °C agitandola leggermente per stabilizzare il pH e favorire il costituirsi di una flora microbica stabile. Misurare nuovamente il pH, che deve essere di $6,0 \pm 0,5$. Mescolare la sospensione di torba con gli altri componenti (sabbia e argilla caolinica) e con acqua deionizzata, fino ad ottenere un sedimento omogeneo con tenore in acqua pari al 30–50 % del peso secco del sedimento. Misurare ancora una volta il pH della miscela finale e regolare a 6,5-7,5 con CaCO_3 se necessario. Tuttavia, se si prevede lo sviluppo di ammoniaca, può essere utile mantenere il pH del sedimento al di sotto di 7,0 (ad esempio tra 6,0 e 6,5). Prelevare campioni di sedimento per determinare il peso secco e il tenore di carbonio organico. Se si prevede lo sviluppo di ammoniaca, il sedimento artificiale può essere condizionato per sette giorni alle medesime condizioni in cui si realizzerà la prova (ad es. rapporto sedimento-acqua 1: 4, altezza dello

strato di sedimento uguale a quella nei recipienti di prova) prima dell'addizione della sostanza chimica in esame, vale a dire che va coperto con acqua che deve essere areata. Alla fine di questo periodo di condizionamento, l'acqua sovrastante deve essere rimossa ed eliminata. Successivamente, la sabbia di quarzo addizionata viene mescolata con il sedimento per ciascun livello di trattamento; il sedimento è distribuito nei recipienti delle repliche e coperto con l'acqua di prova. I recipienti vengono quindi incubati alle stesse condizioni in cui si realizzerà la prova. È in questo momento che si avvia il periodo di equilibratura. L'acqua sovrastante deve essere areata.

La fonte alimentare scelta deve essere aggiunta prima o durante l'addizione al sedimento della sostanza chimica in esame. La stessa può essere inizialmente mescolata con la sospensione di torba (cfr. sopra). Tuttavia, un'eccessiva degradazione della fonte alimentare prima dell'aggiunta degli organismi sperimentali, ad esempio in caso di un lungo periodo di equilibratura, può essere evitata limitando il più possibile il periodo che intercorre tra l'aggiunta del prodotto alimentare e l'inizio dell'esposizione. Al fine di garantire che la sostanza chimica in esame sia addizionata al prodotto alimentare, la fonte alimentare va mescolata con il sedimento al più tardi il giorno in cui la sostanza chimica in esame è addizionata al sedimento.

Conservazione

I componenti secchi del sedimento artificiale possono essere conservati in luogo fresco e asciutto, a temperatura ambiente. Il sedimento preparato e addizionato con la sostanza chimica in esame deve essere usato immediatamente nella prova. È possibile conservare i campioni di sedimento addizionato fino all'analisi alle condizioni raccomandate per la sostanza chimica in esame.

RIFERIMENTI

- (1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (2) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

Appendice 5

Metodi di allevamento per il *Lumbricus variegatus*

Il *Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), della famiglia dei *Lumbriculidae* e sottoclasse degli Oligocheti, vive nel sedimento di acqua dolce ed è ampiamente utilizzato nelle prove eco-tossicologiche. Può essere facilmente allevato in condizioni di laboratorio. Segue un'illustrazione dei metodi di allevamento.

Metodi di allevamento

Le condizioni di allevamento del *Lumbriculus variegatus* sono descritte dettagliatamente in Phipps et al. (1993) (1), Brunson et al. (1998) (2), ASTM (2000) (3), U.S. EPA (2000) (4). Una breve sintesi di tali condizioni è riportata qui di seguito. Uno dei principali vantaggi del *L. Variegatus* è la riproduzione in tempi brevi, con conseguente rapido aumento della biomassa nelle popolazioni allevate in laboratorio (ad esempio (1), (3), (4), (5)).

I vermi possono essere allevati in grandi acquari (57-80 l) a 23 °C, con un fotoperiodo luce/buio pari a 16:8 (100-1 000 lux) usando acqua naturale rinnovata quotidianamente (45-50 litri per acquario). Il substrato viene preparato mediante fogli assorbenti di carta marrone non sbiancati, tagliati in strisce, che possono quindi essere imbevuti in acqua di coltura per alcuni secondi per trasformarsi in piccoli pezzi di substrato di carta. Questo substrato può essere usato direttamente per l'allevamento del *Lumbriculus*: lo si può usare per coprire il fondo del serbatoio oppure lo si può congelare in acqua deionizzata per un impiego successivo. Il nuovo substrato nel serbatoio di norma durerà per circa due mesi.

Ciascun allevamento di vermi inizia con 500-1 000 esemplari, nutriti con 10 ml di sospensione contenente 6 grammi di alimento iniziale per trote 3 volte a settimana, con rinnovo o flusso continuo dell'acqua. Per allevamenti statici o semistatici vanno previste frequenze minori di somministrazione del cibo al fine di evitare la proliferazione di funghi e batteri..

In tali condizioni il numero di esemplari dell'allevamento raddoppia generalmente in 10-14 giorni.

In alternativa, il *Lumbriculus variegatus* può anche essere allevato in un sistema costituito da uno strato di sabbia di quarzo come quello utilizzato per il sedimento artificiale (1-2 cm di spessore) e da acqua ricostituita. Come recipienti di allevamento possono essere usati contenitori in vetro o acciaio inossidabile con un'altezza da 12 a 20 cm. Il corpo idrico dei recipienti deve essere leggermente aerato (ad esempio 2-4 bolle al secondo) per mezzo di una pipetta Pasteur posizionata a circa 2 cm sopra la superficie del sedimento. Per evitare l'accumulo di ammoniaca, ad esempio, l'acqua sovrastante deve essere cambiata mediante un sistema a flusso continuo oppure, almeno una volta alla settimana, manualmente. Gli oligocheti possono essere tenuti a temperatura ambiente, con un fotoperiodo di 16 ore di luce (a un'intensità luminosa di 100-1 000 lux) e 8 ore di buio. Nella cultura semistatica (di rinnovo dell'acqua una volta a settimana), gli animali sono alimentati con TetraMin due volte alla settimana (ad esempio, 0,6-0,8 mg/cm² di superficie del sedimento), che può essere applicato sotto forma di sospensione di 50 mg di TetraMin per ml di acqua deionizzata.

Il *Lumbriculus variegatus* può essere rimosso dagli allevamenti e riposto in un nuovo becher separato, ad esempio trasferendo il substrato con una rete a maglie molto fini o spostando gli stessi organismi con una pipetta di vetro lucidata a fuoco ad apertura larga (circa 5 mm di diametro). Se il substrato è co-trasferito nel nuovo becher, il becher contenente vermi e substrato è lasciato per una notte in condizioni di flusso continuo, il che eliminerà il substrato del becher, mentre i vermi rimarranno sul fondo del recipiente. In seguito i vermi potranno essere introdotti nei nuovi serbatoi di allevamento preparati o trattati ulteriormente ai fini della prova, come descritto in (3) e (4) o seguenti.

Un aspetto da considerare in modo critico quando si usa il *L. variegatus* nelle prove con sedimento è la sua modalità di riproduzione (architomia o morfallassi, ad es.(6)). Tale riproduzione asseguata produce due frammenti, che non si alimentano per un dato periodo, finché la testa o la coda non si rigenera (ad esempio, (7), (8)). Ciò significa che nel *L. variegatus* l'esposizione tramite ingestione di sedimento contaminato non avviene senza soluzione di continuità.

Pertanto è necessario procedere a una sincronizzazione al fine di ridurre al minimo la riproduzione e rigenerazione incontrollata e le conseguenti forti variazioni nei risultati della prova. Tali variazioni possono verificarsi se alcuni esemplari che si sono frammentati, e pertanto non si sono alimentati per un determinato periodo di tempo, sono meno esposti alla sostanza chimica in esame rispetto ad altri esemplari che non si sono frammentati nel corso della prova (9), (10), (11). Da 10 a 14 giorni prima dell'inizio dell'esposizione, i vermi vanno frammentati artificialmente (sincronizzazione). Per la sincronizzazione vanno selezionati vermi grandi (adulti), che preferibilmente non evidenziano segni di recente morfallassi. Questi vermi possono essere posti su un vetrino in una goccia di acqua di allevamento e sezionati con un bisturi nella regione mediana del corpo. Occorre fare attenzione affinché le estremità posteriori presentino dimensioni simili. Le estremità posteriori dovranno poi rigenerare nuove teste in un recipiente di allevamento che contiene lo stesso substrato di quello usato nell'allevamento e in acqua ricostituita fino all'inizio

dell'esposizione. La rigenerazione di nuove teste è indicata dal fatto che i vermi sincronizzati si infossano nel substrato (la presenza di teste rigenerate può essere confermata dall'ispezione di un sottocampione rappresentativo di esemplari con un microscopio binoculare). È previsto che in seguito gli organismi sperimentali presentino uno stato fisiologico simile. Ciò significa che, quando la riproduzione per morfallassi avviene con vermi sincronizzati durante la prova, si prevede che praticamente tutti gli animali siano esposti in egual misura al sedimento addizionato. L'alimentazione dei vermi sincronizzati dovrebbe avvenire una volta, non appena i vermi cominciano a infossarsi nel substrato, o 7 giorni dopo la dissezione. Il regime di alimentazione deve essere comparabile con gli allevamenti normali, ma può essere opportuno nutrire i vermi sincronizzati con la stessa fonte alimentare utilizzata nella prova. I vermi vanno tenuti alla temperatura di prova, a 20 ± 2 °C. Dopo la rigenerazione, vanno usati per la prova i vermi completi e intatti che nuotano attivamente o si muovono dopo un leggero stimolo meccanico. Lesioni o autotomia dei vermi vanno evitati, ad esempio mediante l'uso di pipette con bordi lucidati a fuoco, o pinze dentarie in acciaio inossidabile quando si manipolano i vermi.

Fonti per allevamenti iniziali del *Lumbriculus variegatus* (indirizzi negli Stati Uniti adattati in base a (4))

Europa

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Germania

Bayer Crop Science AG
Sviluppo — Ecotoxicologia
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Germania

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistonkatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finlandia

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommisenstr. 13
D-01062 Dresden
Germania

C.N.R.- I.R.S.A.
Consiglio Nazionale delle Ricerche italiano
Istituto di ricerca delle acque
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

U.S.A.

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research
Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

RIFERIMENTI

- (1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ. Toxicol. Chem. 12, 269-279.
- (2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.
- (3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (5) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.
- (6) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.
- (7) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.
- (8) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.
- (9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007.
- (10) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.
- (11) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). Environ. Hung. Toxicol. 32, 1503-1508.

Appendice 6

Sintesi dei risultati delle prove interlaboratorio
“Prove di tossicità nel sedimento con *Lumbriculus variegatus*”

Tabella 1

Risultati delle prove interlaboratorio individuali: quantità media dei vermi nei controlli e nei controlli con solvente alla fine della prova; DS = deviazione standard; CV = coefficiente di variazione.

	quantità media di vermi nei controlli	DS	CV (%)	n	quantità media di vermi nei controlli con solvente	DS	CV (%)	n
	32,3	7,37	22,80	3	39,0	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	36,0	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	38,5	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	30,8	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	26,3	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	30,7	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	28,8	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	27,7	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	21,3	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	35,0	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	33,5	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	15,0	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	43,7	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	21,7	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	31,3	4,79	15,32	4
Media interlaboratorio	29,59		20,10		30,61		13,26	
DS	8,32		10,03		7,57		10,48	
n	15				15			
min	16,3				15,0			
max	42,0				43,7			
CV (%)	28,1				24,7			

Tabella 2

Risultati delle prove interlaboratorio individuali: media del peso secco totale dei vermi per replica nei controlli e nei controlli con solvente alla fine della prova; DS = deviazione standard; CV = coefficiente di variazione.

	Peso secco totale dei vermi per replica (controlli)	DS	CV (%)	n	Peso secco totale dei vermi per replica (controlli con solvente)	DS	CV (%)	n
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
Media interlaboratorio	25,15		20,36		27,68		17,53	
DS	7,87		12,56		7,41		9,10	
n	15				15			
min	12,9				10,5			
max	41,3				41,4			
CV (%)	31,3				26,8			

Tabella 3

Tossicità del PCP: sintesi degli endpoint della prova interlaboratorio; medie interlaboratorio per EC₅₀, NOEC e LOEC, DS = deviazione standard, CV = coefficiente di variazione.

Parametro biologico		Media inter-laboratorio (mg/kg)	min	max	Fattore inter-laboratorio	DS	CV (%)	Media geometrica (mg/kg)
Numero complessivo di vermi	EC₅₀	23,0	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	9,9	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	27,9	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	DMR (%)	22,5	7,1	39,1				
Peso secco totale dei vermi	EC₅₀	20,4	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	9,3	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	25,7	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	DMR (%)	24,8	10,9	44,7				
Mortalità/sopravvivenza	LC₅₀	25,3	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOEC	16,5	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	39,1	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
Riproduzione (aumento del numero di vermi per replica)	EC₅₀	20,0	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	7,9	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	22,5	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	DMR (%)	29,7	13,9	47,9				
Crescita (aumento della biomassa per replica)	EC₅₀	15,3	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	8,7	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	24,0	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	DMR (%)	32,2	13,6	65,2				

DMR: differenza minima rilevabile rispetto ai valori di controllo nella verifica di ipotesi; usata come misura del potere statistico.

RIFERIMENTI

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

**C.36 PROVA DI INIBIZIONE DEL TASSO RIPRODUTTIVO DI UN ACARO PREDATORE
(*HYPOASPIS (GEOLAEAPS) ACULEIFER*) IN CAMPIONI DI SUOLO**

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 226 (2008). Il metodo di prova è formulato per valutare gli effetti delle sostanze chimiche contenute nel terreno sul tasso di riproduzione di una specie di acaro del suolo *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini) (Acari: Laelapidae) e permette pertanto di stimare l'inibizione del tasso di crescita della popolazione della specie in esame (1,2). Nella fattispecie, per tasso di riproduzione si intende il numero di esemplari giovani (cioè gli esemplari che non hanno ancora raggiunto lo stadio adulto) presenti al termine del periodo di prova. La specie *H. aculeifer* costituisce un livello trofico aggiuntivo rispetto alle specie per le quali sono già disponibili metodi di prova. Ai fini del presente metodo è considerata appropriata una prova di riproduzione che non comporta né discriminazione né quantificazione delle varie fasi del ciclo riproduttivo. Per le sostanze chimiche i cui scenari di esposizione non si realizzano nel terreno, vanno presi in considerazione approcci alternativi (3).
2. L'acaro della specie *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* è considerato un valido rappresentante della pedofauna e degli acari predatori in particolare. È diffuso in tutto il mondo (5) e può essere facilmente raccolto e coltivato in laboratorio. L'appendice 7 illustra in sintesi la biologia dell'*H. aculeifer*. Informazioni generali sull'ecologia delle specie di acari e sul loro utilizzo nelle prove di ecotossicità sono riportate in (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

PRINCIPIO DELLA PROVA

3. Esemplari adulti di femmine sono esposti a un intervallo di concentrazioni della sostanza chimica in esame mescolata al terreno. All'inizio della prova, 10 femmine adulte sono collocate in ciascun recipiente sperimentale. I maschi non sono inclusi nella prova poiché l'esperienza dimostra che — in presenza dei maschi — le femmine si accoppiano subito dopo aver superato lo stadio di deutoninfa. Inoltre, l'inclusione di maschi richiederebbe una laboriosa discriminazione delle fasi di sviluppo, con l'effetto di prolungare la prova. Di conseguenza, la fase dell'accoppiamento non rientra nella procedura di prova. Le femmine sono introdotte nella prova 28-35 giorni dopo l'inizio del periodo di deposizione delle uova in sincronizzazione (cfr. appendice 4), poiché si può ritenere che a quel punto le femmine si siano già accoppiate e abbiano superato la fase di pre-ovideposizione. Alla temperatura di 20 °C, la prova termina il 14° giorno dopo l'introduzione delle femmine (giorno 0), durata che consente alla prima progenie del gruppo di controllo di giungere allo stadio di deutoninfa (cfr. appendice 4). Come principale variabile di misurazione si calcola il numero di esemplari giovani per ciascun recipiente di prova nonché il numero di femmine sopravvissute. Il tasso riproduttivo degli acari esposti alla sostanza chimica in esame è confrontato con quello dei campioni di controllo al fine di determinare la EC_x (per esempio EC₁₀, EC₅₀) o la concentrazione senza effetti osservabili (NOEC) (cfr. l'appendice 1 per le definizioni), a seconda del disegno sperimentale prescelto (cfr. paragrafo 29). Una descrizione generale del calendario della prova è contenuta nell'appendice 8.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA CHIMICA IN ESAME

4. È auspicabile conoscere l'idrosolubilità, il log K_{ow}, il coefficiente di ripartizione acqua/terreno e la pressione di vapore della sostanza chimica in esame. È utile raccogliere informazioni supplementari sull'evoluzione della sostanza chimica in esame nel terreno, segnatamente i tassi di degradazione biotica e abiotica.
5. Il presente metodo di prova può essere utilizzato per sostanze chimiche idrosolubili o insolubili in acqua. Tuttavia, la modalità di applicazione della sostanza chimica in esame varierà di conseguenza. Questo metodo di prova non si applica alle sostanze volatili, vale a dire le sostanze la cui costante di Henry o il coefficiente di ripartizione acqua/aria sono superiori a 1, o le sostanze la cui pressione di vapore supera 0,0133 Pa a 25 °C.

VALIDITÀ DELLA PROVA

6. Il risultato della prova è considerato valido se i controlli non trattati soddisfano i seguenti criteri:
 - la mortalità media delle femmine adulte non supera il 20 % al completamento della prova;
 - il numero medio di esemplari giovani per replica (dove sono state introdotte 10 femmine adulte) è pari ad almeno 50 al completamento della prova;
 - il coefficiente di variazione calcolato per il numero di esemplari giovani di acari per replica non supera il 30 % al completamento della prova finale.

SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

7. Per garantire che le condizioni sperimentali del laboratorio siano adeguate e per verificare che la risposta degli organismi sperimentali rimanga costante nel corso del tempo, deve essere effettuato il calcolo della EC_x e/o NOEC della sostanza chimica di riferimento. Il dimetoato (CAS 60-51-5) rappresenta un'adeguata sostanza chimica di riferimento di cui è stato dimostrato l'effetto sulla dimensione della popolazione (4). L'acido borico (CAS 10043-35-3) può essere utilizzato in alternativa, ma gli studi su tale sostanza di riferimento sono meno numerosi. Sono disponibili due opzioni sperimentali:
- la sostanza di riferimento può essere testata in parallelo alla determinazione della tossicità di ciascuna sostanza chimica in esame ad una concentrazione che — come deve essere preliminarmente dimostrato da uno studio dose-risposta — induce una riduzione della prole superiore al 50 %. In tal caso, il numero delle repliche deve essere identico a quello dei controlli (cfr. paragrafo 29).
 - In alternativa, si può sottoporre la sostanza chimica di riferimento ad una prova dose-risposta 1-2 volte all'anno. A seconda del disegno sperimentale scelto variano il numero di concentrazioni e di repliche così come il fattore di distanza (cfr. paragrafo 29), ma si deve ottenere una risposta pari al 10-90 % dell'effetto (fattore di distanza: 1,8). La EC₅₀ del dimetoato calcolata sulla base del numero di esemplari giovani dev'essere compresa tra 3,0 e 7,0 mg di sostanza attiva/kg di terreno (in peso secco). Sulla base dei risultati conseguiti finora con l'acido borico, la EC₅₀ basata sul numero degli esemplari giovani deve essere compresa nell'intervallo di 100-500 mg/kg di terreno (in peso secco).

DESCRIZIONE DEI FATTI

Recipienti e apparecchiatura di prova

8. Occorre utilizzare recipienti in vetro o in altro materiale chimicamente inerte del diametro di 3-5 cm (altezza del terreno \geq 1,5 cm), muniti di un coperchio a chiusura ermetica. È preferibile utilizzare i tappi a vite: in tal caso bisogna aerare i recipienti due volte a settimana. È altresì possibile utilizzare coperchi che consentono uno scambio gassoso diretto tra il substrato e l'atmosfera (ad es. garza). Il tasso di umidità deve essere sufficientemente elevato durante la prova, ed è pertanto essenziale verificare il peso di ciascun recipiente di prova durante la prova e aggiungere acqua se necessario. Tale controllo è particolarmente importante se non si dispone di tappi a vite. Se i recipienti sono opachi, il coperchio deve essere costituito di materiale che consente alla luce di filtrare (ad esempio un coperchio trasparente perforato), ma impedisca la fuga degli acari. Le dimensioni e il tipo del recipiente di prova dipendono dal metodo di estrazione (cfr. appendice 5 per ulteriori dettagli). Quando si procede a un'estrazione mediante calore direttamente nel recipiente di prova, si deve aggiungere sul fondo una rete a maglie di dimensioni adeguate (che rimarrà sigillata fino all'estrazione), e lo spessore del terreno deve essere sufficiente per individuare un gradiente di temperatura e di umidità.
9. La prova richiede un'apparecchiatura standard di laboratorio, in particolare:
- recipienti di vetro, preferibilmente con tappi a vite;
 - camera di essiccazione;
 - stereomicroscopio;
 - pennelli per il trasferimento degli acari;
 - pH-metro e luxmetro;
 - bilance sufficientemente accurate;
 - adeguati strumenti di controllo della temperatura;
 - adeguati strumenti di controllo dell'umidità dell'aria (facoltativi se i recipienti sono dotati di coperchio);
 - incubatore o piccola camera a temperatura controllata;
 - apparecchiatura di estrazione (cfr. appendice 5) (13);
 - pannello luminoso sospeso con regolazione della luce;
 - barattoli di raccolta per gli acari estratti.

Preparazione del terreno artificiale

10. Per questa prova viene utilizzato un terreno artificiale. Esso consiste dei seguenti componenti (tutti i valori sono commisurati alla massa secca):
 - 5 % di torba di sfagno, essiccata all'aria e finemente macinata (è accettabile una granulometria di 2 ± 1 mm);
 - 20 % di argilla caolinica (tenore di caolinite di preferenza superiore al 30 %);
 - 74 % ca. di sabbia industriale essiccata all'aria (a seconda della quantità di CaCO_3 necessaria), sabbia a grana prevalentemente fine con oltre il 50 % di particelle di granulometria compresa tra 50 e 200 micron. Il quantitativo esatto di sabbia dipende dalla quantità di CaCO_3 (cfr. *infra*): la quota combinata dei due componenti deve raggiungere il 75 %;
 - < 1,0 % di carbonato di calcio (CaCO_3 in polvere, grado analitico) per ottenere un pH di $6,0 \pm 0,5$; la quantità di carbonato di calcio da aggiungere dipende soprattutto dalla qualità e dalla natura della torba (cfr. nota 1).

Nota 1: La quantità di CaCO_3 necessaria dipenderà dai componenti del substrato del terreno e deve essere determinata misurando il pH su campioni prelevati nel terreno immediatamente prima della prova (14).

Nota 2: Il tenore di torba nel terreno artificiale differisce da quello raccomandato negli altri metodi di prova su organismi del suolo, in cui si utilizza nella maggior parte dei casi il 10 % di torba [ad esempio (15)]. Tuttavia, secondo l'EPPO (16), un tipico terreno agricolo non contiene più del 5 % di materia organica e la riduzione del tenore di torba riflette quindi la ridotta capacità di un terreno naturale di assorbire la sostanza chimica in esame rispetto al carbonio organico.

Nota 3: Se necessario, ad esempio per specifiche finalità sperimentali, possono essere utilizzati come substrato di prova e/o di coltura terreni naturali provenienti da siti non inquinati. Tuttavia, quando si utilizza un terreno naturale, occorre caratterizzarlo almeno in base ad origine (sito di prelievo), pH, consistenza (distribuzione granulometrica) e tenore di materia organica. Se disponibili, vanno indicati il tipo e la denominazione del terreno in base alla relativa classificazione e il terreno deve essere esente da contaminazioni. Se la sostanza chimica in esame è un metallo o un composto organometalllico, si deve inoltre stabilire la capacità di scambio cationico (CESC) del terreno naturale. Si deve prestare particolare attenzione a soddisfare i criteri di validità, poiché i dati di riferimento sui terreni naturali sono generalmente scarsi.

11. I componenti secchi del terreno sono mescolati accuratamente (ad esempio in un grande miscelatore da laboratorio). Il pH è determinato mediante un miscuglio di terreno e una soluzione 1 M di cloruro di potassio (KCl) o una soluzione 0,01 M di cloruro di calcio (CaCl_2) in un rapporto 1:5 [cfr. (14) e appendice 3]. Se l'acidità del suolo è superiore al limite richiesto (cfr. paragrafo 10), essa può essere adeguata mediante un quantitativo adeguato di CaCO_3 . Se il suolo è troppo alcalino, il pH può essere ridotto con l'aggiunta di un supplemento della miscela contenente i primi tre componenti descritti al paragrafo 10, ad esclusione del CaCO_3 .
12. La capacità massima di ritenzione idrica (WHC) del terreno artificiale è determinata conformemente ai protocolli descritti nell'appendice 2. Da due a sette giorni prima dell'inizio della prova, il terreno artificiale secco è prenumidito mediante aggiunta di una quantità sufficiente di acqua distillata o deionizzata fino a raggiungere circa la metà del tenore d'umidità finale, ossia il 40-60 % della WHC massima. Il tasso d'umidità viene portato al 40-60 % della capacità massima di ritenzione idrica aggiungendo la soluzione con la sostanza chimica in esame e/o acqua distillata o deionizzata (cfr. paragrafi 16-18). È possibile stimare approssimativamente il tasso di umidità del terreno premendo delicatamente un pugno di terreno in mano: se il tasso di umidità è corretto, appaiono piccole gocce d'acqua tra le dita.
13. Il tenore di umidità del terreno è determinato all'inizio e alla fine della prova mediante essiccazione a 105 °C a peso costante, conformemente alla norma ISO 11465 (17), e la determinazione del pH del terreno avviene conformemente all'appendice 3 o alla norma ISO 10390 (14). Tali misurazioni devono essere realizzate in campioni supplementari senza acari, prelevati sia dal terreno di controllo sia da terreni contenenti ciascuna concentrazione sperimentale. Il pH del terreno non va aggiustato quando si testano sostanze acide o basiche. Occorre verificare il tenore di umidità durante tutta la prova mediante pesatura periodica dei recipienti (cfr. paragrafi 20 e 24).

Selezione e preparazione degli animali sperimentali

14. La specie utilizzata nella prova è *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*, (Canestrini, 1883). Per dare inizio alla prova sono necessari esemplari adulti di femmine, ottenuti da una coorte sincronizzata. Gli acari sono introdotti circa 7-14 giorni dopo il passaggio allo stadio adulto, da 28 a 35 giorni dopo l'inizio della deposizione delle uova in fase di sincronizzazione (cfr. paragrafo 3 e appendice 4). Vanno registrati la fonte degli acari o il fornitore così come la manutenzione della coltura di laboratorio. Se si mantiene una coltura di laboratorio, si raccomanda di confermare l'identità della specie almeno una volta all'anno. L'appendice 6 contiene una scheda di identificazione.

Preparazione delle concentrazioni sperimentali

15. La sostanza chimica in esame viene mescolata al terreno. La scelta dei solventi organici utilizzati per facilitare il trattamento del suolo con la sostanza chimica in esame va effettuata sulla base di criteri di bassa tossicità per gli acari; un adeguato controllo con solvente deve essere incluso nel disegno sperimentale (cfr. paragrafo 29).

Sostanza idrosolubile

16. Una soluzione della sostanza chimica in esame è preparata in acqua deionizzata in quantità sufficiente per tutte le repliche con la stessa concentrazione sperimentale. Si raccomanda di utilizzare la quantità d'acqua necessaria per ottenere il tenore di umidità richiesto, ossia il 40-60 % della capacità massima di ritenzione idrica (cfr. paragrafo 12). Ciascuna soluzione della sostanza chimica in esame è mescolata accuratamente con un lotto di terreno pre-inumidito, prima di essere inserita nel recipiente di prova.

Sostanza insolubile in acqua

17. Le sostanze chimiche insolubili nell'acqua, ma solubili in solventi organici possono essere dissolte nel minor volume possibile di un appropriato mezzo disperdente (ad esempio acetone). Vanno utilizzati soltanto solventi volatili. Quando si utilizzano tali solventi, tutte le concentrazioni di prova e il campione di controllo ne devono contenere la stessa quantità minima. Il solvente viene nebulizzato su o mescolato con una piccola quantità, ad esempio, 10 g, di sabbia fine di quarzo. Occorre rettificare il contenuto totale di sabbia nel substrato per tener conto di tale quantità. Inoltre, il solvente viene rimosso per evaporazione sotto cappa aspirante per almeno un'ora. Questa miscela di sabbia di quarzo e sostanza chimica in esame è incorporata al terreno preinumidito, mescolando a fondo dopo laggiunta della quantità necessaria di acqua deionizzata per raggiungere il grado di umidità richiesto. La miscela finale è distribuita nei recipienti di prova. Si noti che taluni solventi possono essere tossici per gli acari. Pertanto, si raccomanda di utilizzare un campione di controllo d'acqua aggiuntivo senza solvente se la sua tossicità non è nota. Se è adeguatamente dimostrata l'assenza di effetti del solvente (alle concentrazioni utilizzate) il controllo d'acqua non è necessario.

Sostanza poco solubile in acqua e nei solventi organici

18. Per le sostanze chimiche poco solubili in acqua e nei solventi organici, si mescolano l'equivalente di 2,5 g di sabbia di quarzo finemente macinata per recipiente di prova (ad esempio, 10 g di sabbia fine di quarzo per quattro repliche) alla quantità di sostanza chimica in esame per ottenere la concentrazione sperimentale voluta. Occorre rettificare il contenuto totale di sabbia nel substrato per tener conto di tale quantità. Questa miscela di sabbia di quarzo e sostanza in esame è incorporata al terreno preinumidito, mescolando a fondo dopo laggiunta della quantità necessaria di acqua deionizzata per raggiungere il grado di umidità richiesto. La miscela finale è distribuita nei recipienti di prova. La procedura è ripetuta per ciascuna concentrazione sperimentale, preparando anche un idoneo controllo.

PROCEDURA

Gruppi di prova e gruppi di controllo

19. Si raccomanda di usare 10 femmine adulte in 20 g di peso secco di terreno artificiale in ciascun recipiente di prova e di controllo. Gli organismi sperimentali devono essere aggiunti entro due ore dalla preparazione del substrato di prova finale (ossia dopo l'applicazione della sostanza chimica in esame). In alcuni casi specifici (ad esempio, se l'invecchiamento è considerato un fattore determinante), il tempo trascorso tra la preparazione del substrato di prova finale e laggiunta di acari può essere prolungato [per i dettagli sull'invecchiamento, cfr. (18)]. Occorre tuttavia fornire una giustificazione scientifica di tale decisione.

20. Una volta aggiunti gli acari nel terreno, gli animali sono alimentati e il peso iniziale di ciascun recipiente di prova deve essere misurato e utilizzato come riferimento per monitorare il tenore di umidità del suolo per tutta la durata della prova, come descritto al paragrafo 24. I recipienti di prova vanno quindi coperti, come descritto nel paragrafo 8, e inseriti nella camera sperimentale.
21. Sono preparati controlli appropriati per ciascuno dei metodi di applicazione della sostanza chimica in esame, presentati nei paragrafi da 15 a 18. La preparazione dei controlli si conforma ai protocolli descritti, tranne per il fatto che non viene aggiunta la sostanza chimica in esame. Pertanto, se del caso, nei controlli sono utilizzati solventi organici, sabbia di quarzo o altri mezzi disperdenti in concentrazioni/quantità equivalenti a quelle dei trattamenti. Quando si utilizza un solvente o un altro mezzo disperdente per addizionare la sostanza chimica in esame, occorre predisporre e testare anche un controllo supplementare privo del mezzo disperdente o della sostanza in esame ogniqualvolta sia ignota la tossicità del solvente (cfr. paragrafo 17).

Condizioni sperimentali

22. La temperatura di prova deve essere di 20 ± 2 °C e deve essere registrata almeno una volta al giorno e corretta, se necessario. La prova è svolta in condizioni di cicli controllati di luce e di buio (preferibilmente 16 ore di luce e 8 di buio) con un illuminamento di 400-800 lux in prossimità dei recipienti di prova. Ai fini di comparabilità, tali condizioni sono identiche a quelle applicate in altri test ecotossicologici in campioni di terreno [ad esempio (15)].
23. Quando si usano i tappi a vite devono essere assicurati gli scambi gassosi mediante aerazione dei recipienti di prova almeno due volte alla settimana. Se i recipienti sono coperti con garza, va prestata particolare attenzione a mantenere il tenore di umidità del terreno (cfr. paragrafi 8 e 24).
24. Il tenore di acqua del substrato di terreno nei recipienti di prova va preservato per tutta la durata della prova pesando i recipienti di prova e, se necessario, aggiungendovi periodicamente dell'acqua (ad esempio una volta alla settimana). Le perdite devono essere compensate, come necessario, con acqua deionizzata. Il tasso d'umidità durante la prova non deve discostarsi di oltre il 10 % dal valore iniziale.

Alimentazione

25. È stato dimostrato che gli acari del formaggio [*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)] costituiscono una fonte alimentare adeguata. Possono essere adatti anche piccoli Collemboli [e.g. larve di *Folsomia candida* (Willem, 1902) o *Onychiurus fimatus* (19), (20)], Enchitreidi [e.g. *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe, 1992)] o Nematodi [e.g. *Turbatrix silusiae* (de Man, 1913)] (21). Si raccomanda di controllare il cibo prima di utilizzarlo in una prova. Il tipo e la quantità di cibo devono garantire che sia disponibile un numero sufficiente di esemplari giovani in modo da soddisfare i criteri di validità (paragrafo 6). Nella scelta delle prede occorre considerare il meccanismo d'azione della sostanza chimica in esame (per esempio un acaricida può rivelarsi tossico anche per gli acari che servono come alimento, cfr. paragrafo 26).
26. L'alimentazione va fornita *ad libitum* [ma ogni volta in piccole quantità (punta di spatola)]. A tal fine, possono essere utilizzati anche un dispositivo di aspirazione di bassa potenza, come proposto nelle prove sui Collemboli, o un pennello fine. Generalmente sarà sufficiente amministrare il cibo all'inizio della prova e quindi due o tre volte a settimana. Se la sostanza chimica in esame si rivela tossica per la preda, occorrerà considerare un aumento della frequenza di alimentazione e/o l'utilizzo di una fonte alternativa di alimenti.

Selezione delle concentrazioni sperimentali

27. È utile raccogliere informazioni preliminari sulla tossicità della sostanza chimica in esame, derivanti ad esempio da studi per definire gli intervalli di concentrazione (*range-finding studies*), ai fini della scelta delle adeguate concentrazioni sperimentali. Se necessario, si conduce un test preliminare per definire gli intervalli di concentrazione con cinque concentrazioni della sostanza chimica in esame nell'intervallo di 0,1-1 000 mg/kg di terreno secco, con almeno una replica per ciascun trattamento e un gruppo di controllo. Il *range-finding test* deve durare 14 giorni, al termine dei quali sono determinati la mortalità degli acari adulti e il numero degli esemplari giovani. Nella prova finale è preferibile scegliere un intervallo di concentrazioni che includa le concentrazioni che producono un effetto sul numero degli esemplari giovani ma non sulla sopravvivenza della generazione progenitrice. Ciò è tuttavia escluso per le sostanze chimiche che causano effetti letali e subletali a concentrazioni analoghe. La concentrazione che determina un effetto (ad esempio CE₅₀, CE25, CE10) e l'intervallo delle concentrazioni alle quali la sostanza in esame produce un effetto d'interesse devono rientrare tra le concentrazioni incluse nella prova. L'estrapolazione di valori molto inferiori alla concentrazione più bassa che incide sugli organismi sperimentali o superiori alla concentrazione sperimentale massima testata va effettuata solo in casi eccezionali e giustificata in modo dettagliato nella relazione.

Disegno sperimentale

Test di dose/risposta

28. Sono proposti tre disegni sperimentali, basati sulle raccomandazioni di un'altra prova interlaboratorio (*ring test*) [prova di riproduzione di Enchitreidi (22)]. L'adeguatezza generale di questi tre disegni sperimentali è stata confermata dai risultati della validazione della specie *H. aculeifer*.
29. Nel definire l'intervallo delle concentrazioni è necessario tenere conto dei seguenti elementi:
 - Per determinare la EC_x (per esempio EC₁₀, EC₅₀) è necessario testare 12 concentrazioni. Si raccomanda di prevedere almeno due repliche per ciascuna concentrazione sperimentale e 6 campioni di controllo. Il fattore di distanza può variare, ma deve essere inferiore o pari a 1,8 nell'intervallo degli effetti previsti e superiore a 1,8 a concentrazioni superiori e inferiori.
 - Per determinare la NOEC, occorre testare almeno cinque concentrazioni in serie geometrica. Si raccomanda di includere quattro repliche per ciascuna concentrazione sperimentale e 8 campioni di controllo. Le concentrazioni devono distanziarsi tra loro di un fattore non superiore a 2,0.
 - Un approccio combinato permette di determinare la NOEC e la EC_x, utilizzando otto concentrazioni di prova, disposte in serie geometriche. Si raccomanda di includere quattro repliche di trattamento e 8 controlli. Le concentrazioni devono distanziarsi tra loro di un fattore non superiore a 1,8.

Prova limite

30. Se la concentrazione massima (ad esempio 1 000 mg/kg) individuata nel test di definizione dell'intervallo delle concentrazioni (*range-finding test*) non produce alcun effetto, la prova finale di riproduzione può essere effettuata come prova limite, alla concentrazione sperimentale di 1 000 mg/kg di peso secco di terreno. Una prova limite consente di dimostrare che la NOEC o la EC₁₀ per la riproduzione è superiore alla concentrazione limite, utilizzando il numero minimo di acari. Vanno utilizzate 8 repliche sia per il suolo trattato sia per il controllo.

Durata della prova e misurazioni

31. Vanno registrate tutte le differenze di comportamento e morfologia degli acari osservate nei controlli e nei recipienti trattati.
32. Il 14^o giorno gli acari superstizi sono estratti dal suolo mediante calore/luce o con un altro metodo appropriato (cfr. appendice 5). Gli esemplari giovani (cioè larve, protoninfe e deutoninfe) e adulti sono contati separatamente. Tutti gli acari adulti non recuperati in questa fase devono essere registrati come morti, poiché si suppone che siano morti e decomposti prima della valutazione. Occorre convalidare l'efficienza d'estrazione una o due volte all'anno su controlli contenenti valori noti di adulti e giovani. L'efficienza deve essere superiore in media al 90 %, combinata per tutte le fasi di sviluppo (cfr. appendice 5). I conteggi degli adulti e dei giovani non vanno adeguati in funzione dell'efficienza.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

33. I paragrafi da 36 a 41 contengono informazioni sui metodi statistici che possono essere usati per analizzare i risultati della prova. Occorre inoltre consultare il documento n. 54 dell'OCSE *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity data: A Guidance to Application* (31).
34. Il principale parametro da valutare (*endpoint*) della prova è il tasso di riproduzione, ossia il numero di giovani esemplari generati per ciascuna replica (in cui sono state introdotte 10 femmine adulte). L'analisi statistica richiede il calcolo della media aritmetica (X) e della varianza (s²) del tasso di riproduzione per trattamento e per controllo. X e s² sono impiegati nelle analisi ANOVA, come il test t di Student, il test di Dunnett o il test di William, oltre che nel calcolo degli intervalli di confidenza al 95 %.

Nota: Questo principale *endpoint* corrisponde alla fecondità misurata come il numero dei giovani vivi generati durante la prova diviso il numero di progenitrici introdotte all'inizio della prova.

35. Il numero di femmine sopravvissute nei controlli non trattati è un criterio di validità fondamentale che deve essere documentato. Come nel test di definizione dell'intervallo delle concentrazioni, anche tutti gli altri segni di nocività vanno riportati nella relazione finale.

EC_x

36. I valori EC_x e i relativi limiti di confidenza al 95 % superiori e inferiori per il parametro descritto nel paragrafo 34 sono calcolati utilizzando metodi statistici adeguati (ad esempio analisi Probit, funzione logistica o di Weibull, metodo semplificato di Spearman-Karber o interpolazione semplice). Si ottiene un valore EC_x inserendo un valore pari a x % della media dei controlli nell'equazione risultante. Per calcolare la EC₅₀ o qualsiasi altra EC_x occorre sottoporre le medie per trattamento (X) a un'analisi di regressione.

NOEC/LOEC

37. Quando si applica un'analisi statistica per determinare la NOEC/LOEC, è necessario disporre di statistiche per recipiente (i singoli recipienti sono considerati repliche). Occorre quindi utilizzare metodi statistici adeguati (conformemente al documento n. 54 dell'OCSE *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity data: A Guidance to Application*). In generale, gli effetti nocivi della sostanza chimica in esame rispetto al controllo sono esaminati applicando un'ipotesi unilaterale (inferiore) con un'analisi a $p \leq 0,05$. I paragrafi che seguono contengono esempi.
38. La distribuzione normale dei dati può essere analizzata, ad esempio, mediante il test di bontà dell'adattamento di Kolmogorov-Smirnov, il test del rapporto tra intervalli e deviazione standard (test R/s) o il test di Shapiro-Wilk (bilaterale, $p \leq 0,05$). Si può utilizzare il test di Cochran, il test di Levene o il test di Bartlett (bilaterale, $p \leq 0,05$) per verificare l'omogeneità della varianza. Se sono soddisfatti i prerequisiti delle procedure di test parametrici (normalità, omogeneità della varianza), possono essere eseguiti un'analisi della varianza ANOVA a un fattore e successivi test multi-comparativi. I confronti multipli (ad esempio, test t di Dunnett) o i test di tendenza regressiva (ad esempio, test di Williams nel caso di una relazione dose-risposta monotona) possono essere utilizzati ai fini del calcolo di eventuali differenze significative ($p \leq 0,05$) tra i controlli e le varie concentrazioni della sostanza chimica in esame (si scelga la prova raccomandata in conformità del documento n. 54 dell'OCSE *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity data: A Guidance to Application*). Si possono tuttavia utilizzare metodi non parametrici (test U di Bonferroni secondo il test di tendenza di Holm o di Jonckheere-Terpstra) per determinare la LOEC e la NOEC.

Prova limite

39. Se è stata svolta una prova limite (confronto tra il controllo e un unico trattamento) e se sono rispettati i presupposti necessari per le procedure delle prove parametriche (normalità, omogeneità), è possibile valutare le risposte metriche mediante il test di Student (t-test). In caso contrario, si può ricorrere al test t per varianze disuguali o a un test non parametrico, come il test di Wilcoxon-Mann-Whitney.
40. Per determinare significative divergenze tra i controlli (campione di controllo e controllo con solvente), le repliche di ciascun controllo possono essere testate come descritto per la prova limite. Se le prove non rilevano alcuna differenza significativa, è possibile raggruppare assieme tutte le repliche di controllo e controlli con solvente. In caso contrario, occorre confrontare tutti i trattamenti con il controllo con solvente.

Relazione sulla prova

41. La relazione sulla prova deve quantomeno includere le seguenti informazioni:
- *Sostanza chimica in esame*
 - identità della sostanza chimica in esame, denominazione, partita, lotto e numero CAS, purezza;
 - proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica in esame (ad esempio log K_{ow}, idrosolubilità, pressione di vapore, costante di Henry (H) e di preferenza, informazioni sull'evoluzione della sostanza chimica in esame nel terreno).
 - *Organismi sperimentali*
 - individuazione degli organismi sperimentali e relativo fornitore, descrizione delle condizioni culturali;
 - fascia d'età degli organismi sperimentali.

- *Condizioni sperimentali*
 - descrizione del disegno sperimentale e della procedura;
 - informazioni dettagliate sulla preparazione del terreno di prova; descrizione dettagliata se si utilizza un terreno naturale (origine, storia, distribuzione granulometrica, pH, tenore di materie organiche e, ove applicabile, classificazione del terreno);
 - capacità massima di ritenzione idrica del terreno;
 - descrizione della tecnica utilizzata per somministrare la sostanza chimica in esame nel terreno;
 - dettagli delle sostanze chimiche ausiliarie utilizzate per somministrare la sostanza chimica in esame;
 - dimensione dei recipienti di prova e massa secca di terreno per recipiente di prova;
 - condizioni sperimentali: intensità luminosa, durata dei cicli luce/buio, temperatura;
 - descrizione del regime di alimentazione, tipo e quantità di cibo fornito durante la prova, date di alimentazione;
 - pH e tenore di umidità del terreno all'inizio e durante la prova (controllo e ciascun trattamento);
 - descrizione dettagliata del metodo di estrazione e dell'efficienza di estrazione.
- *Risultati della prova*
 - numero di esemplari giovani determinata in ciascun recipiente di prova al completamento della prova;
 - numero di femmine adulte e mortalità degli adulti (%) in ciascun recipiente di prova al completamento della prova;
 - descrizione dei sintomi evidenti o modifiche evidenti di comportamento;
 - risultati ottenuti con la sostanza chimica di riferimento in esame;
 - sintesi delle analisi statistiche (EC_x e/o NOEC) compresi i limiti di confidenza al 95 % e descrizione del metodo di calcolo;
 - curva della relazione concentrazione-risposta;
 - deviazioni rispetto alle procedure descritte nel presente metodo di prova e eventuali fatti insoliti verificatisi nel corso della prova.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). *Gayana Zool.* 57, 21-46.
- (2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. *Pacific Insects* 24, 259-274.
- (3) Bakker, F.M., Feijje, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. and van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. *JSS — Journal of Soils and Sediments* 3, 73-77.
- (4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2nd edition In: Dahl, F. (Hrsg.): *Die Tierwelt Deutschlands* 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 pp.
- (5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the population development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). In: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): *Modern Acarology*. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487-492
- (6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). *Proc. 2nd Symp. EURAAC*: p 241-249.
- (7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. *Proc. IXth Internat. Congr. Acarol.* 1994, Columbus, Ohio: p 621-628.
- (8) Krogh, P.H. and Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. In: Lokke, H. and van Gestel, C.A.M.: *Handbook of soil invertebrate toxicity tests*. John Wiley Sons, Chichester, p 239-251.

- (9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Römbke, J., Rundgren, S. and Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests — Invertebrates. In: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 pp.
- (10) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395-433.
- (11) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Boden-raubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletal Dosierung. Zool. Beitr. N.F. 34, 413-433.
- (12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. and Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite Hypoaspis aculeifer Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 39, 7154-7157.
- (13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, 95-122.
- (14) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.
- (15) Capitolo C.8. del presente allegato. Tossicità per i lombrichi.
- (16) EPPO (2003): Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8 Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.
- (17) ISO (International Organization for Standardization) (1993). Soil Quality — Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method, No. 11465. ISO, Geneve.
- (18) Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. 2002. Test methods to determine hazards of sparingly soluble metal compounds in soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.
- (19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von Hypoaspis aculeifer Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit Onychiurus fimbriatus Gisin (Collembola). Ges.allg..angew. Ent. 3:122-125.
- (20) Schlosser, H.J., und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilden (Gamasina). Zool.Beitr. N.F. 34(3):395-433.
- (21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. and Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator Hypoaspis aculeifer (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.
- (22) Capitolo C.32 del presente allegato — Prova di riproduzione degli Enchitreidi.
- (23) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No. 11268-2. ISO, Geneve.
- (24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, London, 524 pp.
- (25) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 pp.
- (26) Lesna, I. and Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with “good genes” in a soil predatory mite. Nature 401, 581-583.
- (27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.
- (28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.

-
- (29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). *Zoologica Poloniae* 24, 11-59.
 - (30) Kevan, D.K. McE. and Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of Hypoaspis aculeifer (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). *Acarologia* 6, 647-658.
 - (31) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO (2006)18.
-

Appendice 1

Definizioni

Le seguenti definizioni si applicano ai fini del presente metodo di prova (nella presente prova tutte le concentrazioni che determinano un effetto sono espresse come massa della sostanza chimica in esame in rapporto alla massa secca del terreno di prova):

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

NOEC (No Observed Effect Concentration — concentrazione senza effetti osservabili) la concentrazione della sostanza chimica in esame alla quale non si osserva alcun effetto. Nella fattispecie, la concentrazione che corrisponde alla NOEC non ha alcun effetto statisticamente significativo ($p < 0,05$) rispetto al controllo in un determinato periodo di esposizione.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration — Concentrazione minima a cui si osserva un effetto statisticamente significativo): la concentrazione più bassa che produce un effetto statisticamente significativo ($p < 0,05$) rispetto al controllo in un determinato periodo di esposizione.

EC_x (concentrazione efficace all'x %): la concentrazione che determina un effetto pari all'x % sugli organismi sperimentali in un determinato periodo di esposizione rispetto al controllo. Ad esempio, EC₅₀ è una concentrazione che si ritiene produca un effetto su un parametro sottoposto a valutazione nel 50 % della popolazione esposta nel corso di un determinato periodo di esposizione.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata in applicazione del presente metodo di prova.

Appendice 2

Determinazione della capacità massima di ritenzione idrica del terreno

Il seguente metodo di determinazione della capacità massima di ritenzione idrica del terreno è considerato adeguato. Esso è descritto nell'allegato C della norma ISO DIS 11268-2 [Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction (23)].

Prelevare una determinata quantità (ad es. 5 g) del substrato del terreno di prova mediante appropriato strumento di campionamento (tubo Auger, ecc.). Coprire il fondo del tubo con un pezzo di carta da filtro imbevuta di acqua, e quindi disporlo su un supporto immerso nell'acqua. Il tubo deve essere progressivamente immerso fino a che il livello dell'acqua supera quello del terreno. Lasciare il tubo in acqua per circa tre ore. Poiché non tutta l'acqua assorbita dai capillari del terreno può essere ritenuta, il campione di terreno deve essere lasciato a drenare per 2 ore collocando il tubo sopra un letto di sabbia di quarzo fine molto umida posto in un recipiente chiuso (per evitare l'essiccamiento). Registrare il peso del campione e lasciarlo asciugare ad una temperatura di 105 °C fino al raggiungimento di una massa costante. La capacità di ritenzione idrica (WHC) viene quindi calcolata come segue:

$$\text{WHC (in \% della massa secca)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

dove:

S = massa del substrato saturato in acqua + massa del tubo + massa della carta da filtro

T = tara (massa del tubo + massa della carta da filtro)

D = massa secca del substrato

*Appendice 3***Determinazione del PH del terreno**

Il seguente metodo di determinazione del pH del terreno si basa sulla norma ISO 10390: Qualità del terreno — Determinazione del pH (16).

Lasciare asciugare un determinato quantitativo di terreno a temperatura ambiente per almeno 12 ore. Preparare una sospensione del terreno (contenente almeno 5 g di terreno) in cinque volte il suo volume di una soluzione 1 M di cloruro di potassio (KCl) di grado analitico oppure di una soluzione 0,01 M di cloruro di calcio (CaCl₂) di grado analitico. Agitare vigorosamente la sospensione per cinque minuti e lasciarla depositare per almeno due ore ma non oltre 24 ore. Misurare il pH della fase liquida con un pH-metro, calibrato prima di ciascuna misurazione utilizzando una serie adeguata di soluzioni tampone (pH 4,0 e 7,0, ad esempio).

Appendice 4

Coltura di *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*, di acari degli alimenti e sincronizzazione delle colture**Coltura di *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*:**

Le colture possono essere mantenute in contenitori di plastica o flaconi di vetro riempiti di una miscela di gesso di Parigi e di polvere di carbone (9:1). Il gesso deve restare umido con l'aggiunta, se necessario, di alcune gocce di acqua distillata o deionizzata. Le temperature di coltura ottimali sono comprese nell'intervallo 20 ± 2 °C, il regime di luce/buio non è determinante per questa specie. Le prede possono essere acari della specie *Tyrophagus putrescentiae* o del genere *Caloglyphus* (gli acari degli alimenti devono essere manipolati con cautela poiché possono provocare allergie negli esseri umani); i Nematodi, gli Enchitreidi e i Collemboli costituiscono prede altrettanto adeguate. La loro fonte deve essere documentata. La proliferazione della popolazione può avere inizio da un'unica femmina, poiché i maschi si sviluppano nelle uova non fecondate. Si registra un'ampia sovrapposizione tra le generazioni. Una femmina può vivere almeno 100 giorni e deporre circa 100 uova durante il suo ciclo di vita. Il tasso di ovideposizione massima viene raggiunto tra 10 e 40 giorni (nell'età adulta) e ammonta a 2,2 uova per femmina e per giorno. Lo sviluppo dell'uovo fino allo stadio adulto della femmina dura circa 20 giorni alla temperatura di ca. 20 °C. È necessario sviluppare e conservare più di una coltura prima della prova.

Coltura di *Tyrophagus putrescentiae*:

Gli acari sono mantenuti in un recipiente di vetro ricoperto di lievito di birra finemente polverizzato, inserito in un secchiello di plastica riempito di una soluzione di KNO₃, che impedisce la fuga degli animali. Gli acari degli alimenti sono inseriti sopra la polvere di lievito. Successivamente essi sono mescolati accuratamente a quest'ultima (che va sostituita due volte a settimana) con l'aiuto di una paletta.

Sincronizzazione della coltura

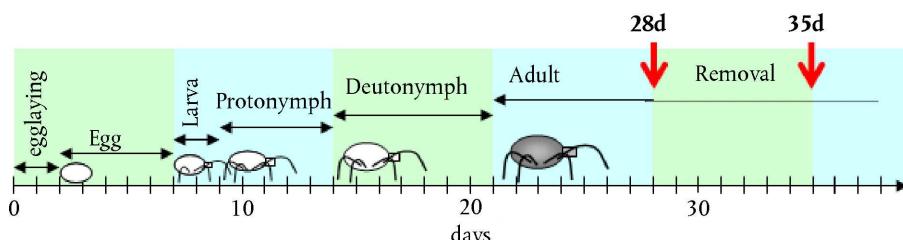
Gli esemplari utilizzati per la prova devono avere all'incirca la stessa età (circa 7 giorni dopo il passaggio allo stadio adulto). Alla temperatura culturale di 20 °C ciò si ottiene nel modo seguente:

Trasferire le femmine in un recipiente di coltura pulito e aggiungere una quantità sufficiente di cibo:

- lasciarle deporre per due o tre giorni, quindi rimuoverle;
- prelevare le femmine adulte per la prova tra il 28° e il 35° giorno dopo l'inizio dell'inserimento delle femmine adulte progenitrici nei recipienti di coltura puliti.

È facile distinguere le femmine adulte dai maschi e da esemplari in altri stadi di sviluppo grazie alla loro dimensione maggiore, la forma globosa, e lo scudo dorsale marrone (i maschi sono più sottili e piatti); gli esemplari immaturi sono di colore bianco-crema. Lo sviluppo degli acari segue all'incirca lo schema descritto di seguito a 20 °C (cfr. figura): uovo (5 giorni), larva (2 giorni), protoninfia (5 giorni), deutoninfia (7 giorni), periodo di preovideposizione della femmina (2 giorni). Al termine di tale periodo, gli acari passano allo stadio adulto.

Figura

Sviluppo di *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* a 20 °C. (rimozione = femmine utilizzate nella prova)

Gli animali adulti sono prelevati dalla coltura sincronizzata e introdotti nei recipienti di prova tra il 28° e il 35° giorno dopo l'inizio della deposizione delle uova delle progenitrici (ossia 7-14 giorni dopo il passaggio all'età adulta). Ciò garantisce che le femmine abbiano già superato il periodo di preovideposizione e si siano accoppiate con maschi presenti nel recipiente di coltura. Studi condotti su colture di laboratorio suggeriscono che, se i maschi sono presenti, le femmine si accoppiano al passaggio all'età adulta o subito dopo (Ruf, Vaninnen, oss. pers.). È stato scelto un periodo di sette giorni perché esso si integra facilmente nella routine del laboratorio e riduce la variabilità di sviluppo individuale tra gli acari. L'ovideposizione deve essere avviata con un numero di femmine almeno pari a quello che sarà necessario per la prova (per esempio, se servono 400 femmine ai fini della prova, occorre lasciare che almeno 400 femmine depongano le uova per due o tre giorni. Il numero di uova come punto di partenza per la sincronizzazione della popolazione deve essere di almeno 1 200 [rapporto tra i sessi di ca 0,5, mortalità circa 0,2]). Per evitare episodi di cannibalismo, è preferibile che ciascun recipiente contenga non più di 20-30 femmine in periodo di deposizione.

Appendice 5

Metodi di estrazione

L'estrazione mediante calore è un metodo adatto per separare i microartropodi da un terreno o un substrato (cfr. figura). Il metodo si basa sull'attività degli organismi e, quindi, solo gli esemplari attivi possono essere registrati. Il principio dell'estrazione mediante calore consiste nel creare progressivamente condizioni più inospitali nel campione in modo da indurre gli organismi a lasciare il substrato e cadere in un liquido di fissaggio (ad esempio etanolo). I parametri fondamentali sono la durata dell'estrazione e il gradiente delle condizioni applicate, che deteriorano da buone a mediocri fino a diventare negative per gli organismi. La durata delle prove ecotossicologiche deve essere la più breve possibile, poiché una eventuale crescita della popolazione durante l'estrazione falsificherebbe i risultati. Inoltre, le condizioni di temperatura e di umidità nel campione devono rimanere entro valori ai quali gli acari siano in grado di muoversi. Il riscaldamento del campione di terreno provoca l'essiccazione del substrato; se ciò avviene troppo velocemente, alcuni acari potrebbero essiccare prima di riuscire a fuggire.

Di conseguenza, si propone la seguente procedura (24) (25):

Apparecchiatura: imbuto di Tullgren o metodi analoghi quali McFadyen (riscaldamento dall'alto, il campione deve essere collocato sopra un imbuto).

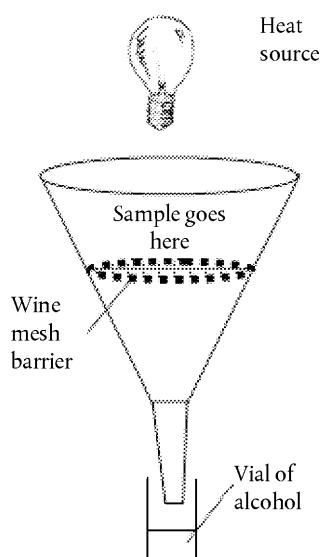
Regime di riscaldamento: 25 °C per 12 ore, 35 °C per 12 ore, 45 °C per 24 ore (48 h in totale). La temperatura del substrato va misurata.

Liquido di fissaggio: etanolo al 70 %

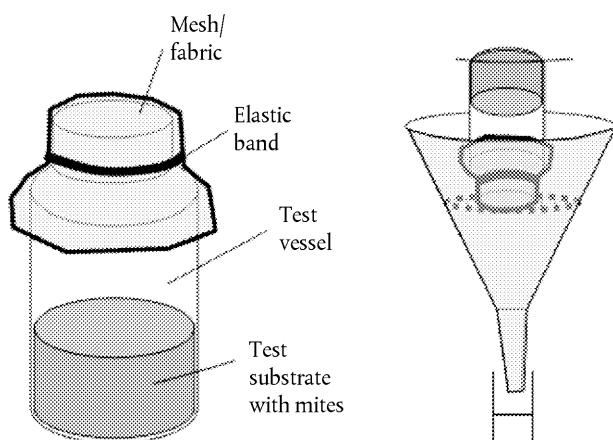
Descrizione particolareggiata: Utilizzare il recipiente di vetro che è servito per la prova. Togliere il coperchio e coprire l'imboccatura con un pezzo di rete o di stoffa. La stoffa deve avere una trama dalle dimensioni di 1,0-1,5 mm. Fissare la stoffa con un elastico. Capovolgere con cautela il recipiente e inserirlo nel dispositivo di estrazione. La stoffa impedisce al substrato di percolare nel liquido di fissaggio, ma lascia che gli acari escano dal campione. Avviare il regime di riscaldamento dopo aver inserito tutti i recipienti nel dispositivo. Terminare l'estrazione dopo 48 ore. Rimuovere le fiale di fissaggio e contare gli acari con un microscopio da dissezione.

Occorre che sia dimostrata l'efficacia di estrazione del metodo scelto una o due volte all'anno utilizzando recipienti che contengono un numero noto di esemplari giovani e adulti di acari allevati in un substrato di prova non trattato. L'efficacia deve essere $\geq 90\%$ (media combinata per tutti gli stadi di sviluppo).

Dispositivo di estrazione di tipo Tullgren



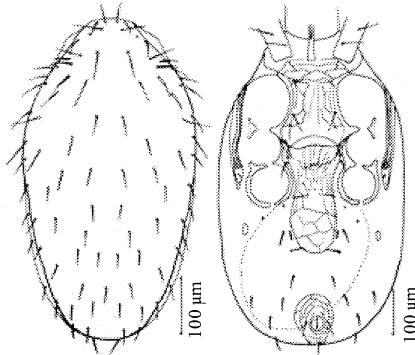
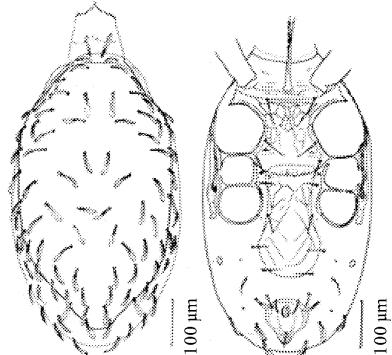
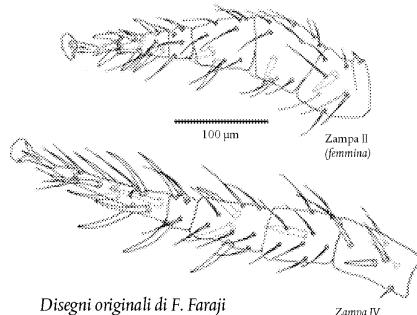
Come preparare il recipiente di prova al completamento della prova e prima dell'estrazione



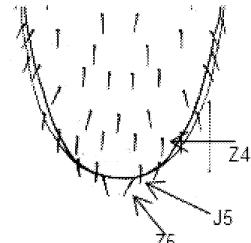
Appendice 6

Identificazione di *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Sottoclasse/Ordine/Sottordine:	Famiglia:	Genere/Sottogenere/Specie:
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	<i>Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer</i>
Autore e data:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23 gennaio 2007	
Letteratura utilizzata:	<p>Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2nd revised edition: 1-523.</p> <p>Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400 pp.</p> <p>Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 pp.</p>	
Caratteristiche morfologiche:	<p>Epistoma con bordo denticolare arrotondato; solchi ipostomali con più di 6 denticoli; setole dorsali caudali di Z4 non molto lunghe; setole dorsali setiformi; scudo genitale normale, poco sviluppato e che non raggiunge lo scudo anale; metà posteriore dello scudo dorsale senza setole non appaiate; zampe II e IV con qualche spessa macrosetola; setola dorsale Z5 circa due volte più lunga di J5; numero fisso di cheliceri con 12-14 denti e un numero variabile con 2 denti; Idiosoma lungo 520-680 µm.</p> <p>Anche gli acari <i>Hypoaspis miles</i> sono utilizzati come indicatore biologico e possono essere confusi con la specie <i>H. aculeifer</i>. La principale differenza è la seguente: gli acari <i>H. miles</i> appartengono al Sottogenere <i>Cosmolaelaps</i> e hanno setole dorsali in forma di lama mentre gli acari <i>H. aculeifer</i> appartengono al Sottogenere <i>Geolaelaps</i> e hanno setole dorsali setiformi.</p>	

*Hypoaspis aculeifer* (Hughes, 1976)*Hypoaspis miles* (Hughes, 1976)

Disegni originali di F. Faraji

Zampa IV
(femmina)*Hypoaspis aculeifer*,
scudo dorsale con setole caratteristiche

Appendice 7

Informazioni generali sulla biologia della specie *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

La specie *Hypoaspis aculeifer* appartiene alla famiglia delle *Lealapidae*, ordine degli *Acari*, classe *Arachnida*, phylum *Arthropoda*. Tali acari vivono in terreni di ogni tipo e si nutrono di altri Acari, Nematodi, Enchitreidi e Collemboli (26). In caso di penuria alimentare diventano cannibali (27). Il corpo degli acari predatori è caratterizzato da due segmenti: idiosoma e gnatosoma. Manca una netta differenziazione tra l'idiosoma nel prosoma (testa) e l'opistosoma (addome). Lo gnatosoma (scudo della testa) contiene gli strumenti preposti all'alimentazione quali le zampe e i cheliceri. I cheliceri sono trisegmentati e dotati di denti di diverse forme. Oltre che ai fini di ingestione i maschi utilizzano i cheliceri anche per trasferire gli spermatozoi alle femmine. Uno scudo dorsale copre quasi completamente l'idiosoma. Gran parte dell'idiosoma della femmina è occupata dagli organi riproduttivi, che sono particolarmente evidenti poco prima dell'ovideposizione. Sulla superficie ventrale si rinvengono due scudi, lo scudo sternale e lo scudo genitale. Tutte le zampe, sono provviste di setole e di spine. Le setole servono ad ancorarsi durante lo spostamento nel terreno o sulla superficie del terreno. Il primo paio di zampe serve essenzialmente come antenne. Il secondo paio di zampe è utilizzato non soltanto per spostarsi, ma anche per immobilizzare la preda. Le spine del 4^o paio di zampe fungono da protezione nonché da "motori di locomozione" (28). I maschi misurano da 0,55 a 0,65 mm di lunghezza, pesano da 10 a 15 µg. Le femmine misurano da 0,8 a 0,9 mm di lunghezza, pesano da 50 a 60 µg (8) (28) (Fig 1).

Figura 1

Femmina, maschio, protoninfa e larva di *H. aculeifer*.



A 23 °C, gli acari raggiungono la maturità sessuale dopo 16 giorni (femmine) e 18 giorni (maschi) (6). Le femmine trasportano gli spermatozoi mediante il solenostoma dal quale sono trasferiti nelle ovaie. Nelle ovaie, gli spermatozoi sono conservati e maturano. La fecondazione avviene solo dopo la maturazione degli spermatozoi nell'ovaio. Gli ovuli fecondati o non fecondati sono depositati dalle femmine in grappoli o separatamente, preferibilmente in crepe o fessure. Le femmine che si sono accoppiate possono generare progenie di entrambi i sessi, mentre dagli ovuli di femmine che non si sono accoppiate escono solo larve di maschi. Nel corso dello sviluppo fino all'età adulta, gli acari attraversano quattro fasi (uovo-larva, larva-protoninfa, protonimfa-deutoninfa, deutoninfa-adulto).

L'uovo è bianco-latte, ialino, ellittico e misura circa 0,37 mm di lunghezza ed è dotato di un solido mantello. In base a (8), la dimensione delle larve è compresa tra 0,42 e 0,45 mm. Le larve hanno solo tre paia di zampe. Nella regione della testa si sviluppano palpi e cheliceri. I cheliceri, muniti di alcuni piccoli denti, sono utilizzati per la schiusa. Dopo la prima muta, 1-2 giorni dopo la schiusa delle uova, si sviluppano le protoninfe, anch'esse bianche, di dimensioni 0,45-0,62 mm (8) che possiedono quattro paia di zampe. I cheliceri sono interamente dotati di denti. A partire da questo stadio gli acari cominciano a cercare nutrimento. A tal fine, gli acari usano i cheliceri per trafiggere la cuticola della preda e iniettarvi una secrezione per la digestione extra-intestinale. Il bolo alimentare può quindi essere succhiato dall'acaro. I cheliceri possono essere utilizzati anche per frammentare grosse porzioni di cibo (28). Dopo una nuova muta gli acari passano allo stadio di deutoninfa, che misurano da 0,60 a 0,80 mm (8) e sono di colore giallo-marrone chiaro. A partire da questo stadio si possono separare in femmine e maschi. Gli acari raggiungono lo stadio adulto dopo un'ulteriore muta, durante la quale gli animali rimangono inattivi e si sviluppa lo scudo marrone (dopo circa 14 giorni) (28) (29) (30). Il ciclo di vita degli acari è compreso tra 48 e 100 giorni a 25 °C (27).

Appendice 8

Sintesi e calendario delle principali azioni da svolgere ai fini della prova

Tempo (giorni) inizio della prova = giorno 0	Azione / compito
Giorno da - 35 a - 28	Trasferimento delle femmine dalla coltura madre in recipienti puliti per avviare la sincronizzazione 2 giorni dopo: rimozione delle femmine due o tre volte a settimana: apporto di cibo sufficiente
Giorno - 5 (+/- 2)	Preparazione del terreno artificiale
Giorno - 4 (+/- 2)	Determinazione della capacità di ritenzione idrica del terreno artificiale Essiccazione durante la notte Giorno successivo: pesatura dei campioni e calcolo della capacità di ritenzione idrica
Giorno - 4 (+/- 2)	Prenumidimento del terreno artificiale per ottenere una capacità di ritenzione idrica del 20-30 %
Giorno 0	Inizio della prova: aggiunta della sostanza chimica in esame nel terreno artificiale Introduzione di 10 femmine in ciascuna replica Pesatura di ciascuna replica Preparazione di controlli abiotici per misurare il tenore di umidità e il pH, 2 repliche per ciascun trattamento Essiccazione dei campioni umidi durante la notte Giorno successivo: pesatura dei controlli umidi Giorno successivo: misurazione del pH dei controlli abiotici essiccati
Giorno 3, 6, 9, 12 (ca.)	Apporto di una quantità sufficiente di prede in ciascuna replica Pesatura di ciascuna replica e aggiunta della quantità d'acqua evaporata
Giorno 14	Completamento della prova: estrazione da tutte le repliche e controlli di efficienza dell'estrazione Essiccazione dei controlli con contenuto d'acqua durante la notte Giorno successivo: pesatura dei controlli con contenuto d'acqua Giorno successivo: misurazione del pH dei controlli essiccati
Giorno 16	Completamento dell'estrazione
Giorno 16 +:	Registrazione del numero di adulti e di giovani nel materiale estratto Registrazione dei risultati in apposite tabelle Descrizione della procedura di prova negli appositi fogli per i protocolli sperimentali

C.37. SAGGIO DI 21 GIORNI SUI PESCI: SCREENING A BREVE TERMINE DELL' ATTIVITÀ ANDROGENICA, ESTROGENICA E DELL'INIBIZIONE DELL'AROMATASI**INTRODUZIONE**

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida TG 230 (2009) dell'OCSE. La necessità di sviluppare e validare un saggio sui pesci per individuare le sostanze che agiscono a livello endocrino, deriva dai timori che i livelli di sostanze chimiche presenti nell'ambiente possano indurre effetti nocivi sull'uomo e sulla fauna selvatica a causa dell'interazione con il sistema endocrino. Nel 1998, l'OCSE ha avviato un'attività ad elevata priorità allo scopo di revisionare le linee guida esistenti ed elaborarne di nuove per lo screening e la valutazione di potenziali interferenti endocrini. Uno degli elementi di tale attività è stata l'elaborazione di una linea guida per l'individuazione delle sostanze chimiche attive sul sistema endocrino di specie ittiche. Il saggio di 21 giorni dell'attività endocrina su pesci è stato sottoposto ad un completo programma di validazione comprendente studi inter-laboratorio con sostanze chimiche selezionate, allo scopo di dimostrare la rilevanza e l'affidabilità della prova per l'individuazione delle sostanze chimiche inibitrici degli estrogeni e dell'aromatasi (1, 2, 3, 4, 5), nelle tre specie ittiche in esame: *Pimephales promelas*, di seguito indicati solo come "ciprinidi", *Oryzias latipes* (medaka) e *Danio rerio* (danio zebrato). L'attività androgenica è rilevabile nelle prime due specie, a differenza di quanto avviene nel danio zebrato. Il presente metodo di prova non consente di individuare le sostanze chimiche antagoniste degli androgeni. I lavori di validazione sono stati sottoposti a revisione da parte di un comitato di esperti designati dai Coordinatori Nazionali del Programma delle Linee Guida dell'OCSE (6). Il saggio non mira a individuare specifici meccanismi di disfunzione ormonale giacché gli organismi di saggio possiedono un asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (asse HPG) sano, in grado di reagire alle sostanze che hanno effetti sull'asse HPG a vari livelli. Il saggio di tossicità a breve termine sulla riproduzione di pesci (TG OCSE 229) include la valutazione della fecondità ed eventualmente, l'istopatologia gonadica in *Pimephales promelas* (ciprinidi), nonché tutti gli endpoint inclusi nel presente metodo di prova. La Linea Guida OCSE 229 fornisce uno screening delle sostanze che agiscono sulla riproduzione attraverso vari meccanismi, tra cui quelli endocrini. È necessario tenere presenti le differenze tra le due linee guida prima di scegliere il metodo di prova più idoneo.
2. Il presente metodo di prova descrive un saggio di screening *in vivo* in cui pesci, maschi sessualmente maturi e femmine riproduttrici insieme, sono esposti a una sostanza di prova, per un tempo limitato del loro ciclo biologico (21 giorni). Al termine dell'esposizione di 21 giorni, sia nei maschi che nelle femmine, sono misurati (a seconda della specie utilizzata) uno o due biomarcatori dell'attività estrogenica, androgenica o di inibizione dell'aromatasi della sostanza chimica di prova. Questi biomarcatori sono la vitellogenina (VTG) e i caratteri sessuali secondari. La vitellogenina viene misurata in *Pimephales promelas* (ciprinidi), *Oryzias latipes* (medaka) e *Danio rerio* (danio zebrato), mentre i caratteri sessuali secondari sono valutati soltanto in *Pimephales promelas* (ciprinidi) e *Oryzias latipes* (medaka).
3. Il presente saggio è una prova *in vivo* per lo screening di taluni meccanismi di azione endocrina e la sua applicazione deve essere considerata nel contesto del "Quadro concettuale dell'OCSE per la sperimentazione e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino" (28).

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

4. La vitellogenina è generalmente prodotta dal fegato delle femmine di vertebrati ovipari in risposta agli estrogeni endogeni. Si tratta di un precursore delle proteine del tuorlo che, una volta prodotto nel fegato, è trasportato, attraverso il flusso sanguigno, agli ovociti in crescita, in cui è incorporato e modificato. La vitellogenina è difficilmente rilevabile nel plasma dei pesci maschi e di femmine immature, a causa dello scarso livello di estrogeni in circolo; tuttavia, il fegato è in grado di sintetizzare e secerne la vitellogenina in risposta ad una stimolazione estrogenica esogena.
5. La misurazione della vitellogenina serve ad individuare sostanze chimiche con differenti meccanismi di azione estrogenica. Come documentato in numerose pubblicazioni scientifiche oggetto di valutazione *inter pares* (ad es. (7)), l'individuazione di sostanze chimiche estrogeniche può essere effettuata misurando l'induzione di vitellogenina nei pesci maschi. L'induzione di vitellogenina è stata anche dimostrata dopo esposizione a androgeni aromatizzabili (8, 9). Una riduzione del livello di estrogeni circolanti nelle femmine, ottenuta, ad esempio, mediante inibizione dell'aromatasi — il complesso enzimatico che converte l'androgeno endogeno in estrogeno naturale 17 β -estradiolo — induce una diminuzione del livello di vitellogenina. Questa viene utilizzata proprio per individuare le sostanze capaci di inibire l'aromatasi (10, 11). La rilevanza biologica della risposta della vitellogenina in seguito all'inibizione degli estrogeni o dell'aromatasi è consolidata ed è stata ampiamente documentata. Tuttavia la produzione di VTG nelle femmine può anche essere influenzata da meccanismi di tossicità generale e da meccanismi d'azione non-endocrini (epatotossicità, ad esempio).

6. Vari metodi di misurazione sono stati sviluppati con successo e armonizzati per i saggi di routine. Questo è il caso dei metodi ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) che sono specie-specifici e utilizzano tecniche di immunochimica per quantificare la vitellogenina utilizzando piccoli campioni di fegato o di sangue prelevati su pesci (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Ai fini della misurazione della VTG possono essere prelevati campioni dalle specie *Pimephales promelas*, ciprinidi (sangue), *Danio rerio*, danio zebrato (sangue o omogenato testa/coda) e *Oryzias latipes*, medaka (fegato). In quest'ultima specie è stata rilevata una buona correlazione fra la concentrazione ematica ed epatica di VTG (19). Le procedure raccomandate per la raccolta dei campioni ai fini dell'analisi della vitellogenina sono descritte nell'appendice 6. Kit per la misurazione della vitellogenina sono comunemente reperibili; si raccomanda che tali kit si basino su un metodo ELISA validato e specifico per la specie in esame.
7. I caratteri sessuali secondari dei pesci maschi di determinate specie sono visibili a occhio nudo, sono quantificabili e rispondono ai livelli degli androgeni endogeni. Ciò vale per *Pimephales promelas* (ciprinidi) e *Oryzias latipes* (medaka) ma non per il danio zebrato, che non possiede caratteri sessuali secondari quantificabili. Le femmine mantengono la capacità di sviluppare caratteri sessuali secondari maschili quando sono esposte a sostanze androgeniche presenti nell'acqua. Diversi studi scientifici documentano questo tipo di risposta in *Pimephales promelas* (ciprinidi) (20) e *Oryzias latipes* (medaka) (21). La diminuzione, nei maschi, dei caratteri sessuali secondari deve essere interpretata con cautela a causa della limitata significatività statistica dei relativi studi. Tale interpretazione, inoltre, dovrebbe basarsi sul giudizio esperto e sulla determinazione del "peso dell'evidenza". L'utilizzo del danio zebrato per questa prova incontra dei limiti a motivo dell'assenza di caratteri sessuali secondari quantificabili capaci di rispondere alle sostanze che agiscono sugli androgeni.
8. In *Pimephales promelas* (ciprinidi) il principale indicatore di esposizione ad androgeni esogeni è il numero dei tubercoli nuziali situati sul muso del pesce femmina. Nella femmina di *Oryzias latipes* (medaka) il numero dei processi papillari costituisce il principale marcatore dell'esposizione ad androgeni esogeni. Le procedure raccomandate per valutare i caratteri sessuali secondari in *Pimephales promelas* (ciprinidi) e *Oryzias latipes* (medaka) sono contenute, rispettivamente, nelle appendici 5A e 5B.
9. Le definizioni dei termini utilizzati nel presente metodo di prova sono contenute nell'appendice 1.

PRINCIPIO DELLA PROVA

10. Pesci maschi e femmine della medesima specie in stato riproduttivo sono esposti alle sostanze chimiche di prova all'interno della stessa vasca. Il loro stato di adulti riproduttori permette una chiara differenziazione tra i sessi e quindi un'analisi di ciascun biomarcatore in funzione del sesso e permette di registrarne la rispettiva sensibilità alle sostanze esogene. Al termine della prova, il sesso è confermato mediante esame macroscopico delle gonadi dopo l'apertura ventrale con forbici. Una tabella riassuntiva delle pertinenti condizioni sperimentali figura nell'appendice 2. Per questa prova si selezionano generalmente esemplari di pesci in condizione di riprodursi, mentre vanno scartati gli esemplari senescenti. La sezione relativa alla "selezione dei pesci" fornisce orientamenti sull'età dei pesci e sul loro stato di riproduttori. La prova è condotta mediante l'esposizione degli animali sperimentali a tre livelli di concentrazione della sostanza chimica in esame ed un controllo con acqua, oltre ad un eventuale controllo con solvente, se necessario. Per ciascun trattamento sono utilizzate due vasche o repliche (ogni vasca contiene 5 maschi e 5 femmine) per *Oryzias latipes* (medaka) e il danio zebrato; mentre quattro vasche o repliche sono utilizzate per trattamento (ogni vasca contenente 2 maschi e 4 femmine) per *Pimephales promelas* (ciprinidi). Ciò permette di tener conto del comportamento territoriale del ciprinide maschio preservando la potenza statistica della prova a un livello sufficiente. Il periodo di esposizione è di 21 giorni ed il campionamento dei pesci è effettuato al 21° giorno di esposizione.
11. All'atto del campionamento effettuato il 21° giorno, tutti gli animali sono soppressi in modo incruento. I caratteri sessuali secondari sono misurati in *Pimephales promelas* (ciprinidi) e in *Oryzias latipes* (medaka) (v. appendice 5A e Appendice 5B); campioni di sangue sono prelevati per misurare la vitellogenina nel danio zebrato e nei ciprinidi; in alternativa può essere utilizzato anche un omogenato testa/coda per la determinazione della vitellogenina nel danio zebrato (appendice 6), mentre a tal fine nei medaka sono effettuati prelievi epatici (appendice 6).

CRITERI DI ACCETTAZIONE DELLA PROVA:

12. Affinché i risultati della prova siano accettabili devono essere soddisfatte le seguenti condizioni:
 - la mortalità nei controlli con acqua (o solvente) non eccede 10 % al termine del periodo di esposizione;
 - la concentrazione dell'ossigeno dissolto è rimasta almeno al 60 % del valore di saturazione in aria per tutto il periodo di esposizione;

- la temperatura dell'acqua non differisce mai di oltre $\pm 1,5$ °C fra le diverse vasche nel periodo di esposizione ed è mantenuta entro un intervallo di 2 °C all'interno del range di temperatura specificato per la specie utilizzata (appendice 2);
- i dati disponibili dimostrano che le concentrazioni della sostanza chimica in esame in soluzione sono state mantenute in modo soddisfacente entro un intervallo del ± 20 % dei valori misurati medi.

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiatura

13. Normale attrezzatura da laboratorio e in particolare:
 - (a) misuratori dell'ossigeno e del pH;
 - (b) attrezzatura per la determinazione della durezza e dell'alcalinità dell'acqua;
 - (c) apparecchiatura adeguata per il controllo della temperatura e preferibilmente per il monitoraggio continuo;
 - (d) vasche in materiale chimicamente inerte e di capacità adeguata in relazione al carico e alla densità di popolazione raccomandati (cfr. appendice 2);
 - (e) substrato di riproduzione per i ciprinidi e il danio zebrato; l'appendice 4 fornisce le necessarie indicazioni dettagliate.
 - (f) bilancia sufficientemente precisa (precisione di $\pm 0,5$ mg).

Acqua

14. Per la prova si può utilizzare qualunque tipo di acqua in cui la specie in esame dimostri di sopravvivere a lungo termine e di crescere in modo adeguato. La qualità dell'acqua dovrebbe essere costante per tutta la durata della prova. Il pH deve essere compreso entro 6,5 e 8,5, ma nel corso della medesima prova deve essere compreso entro un intervallo di $\pm 0,5$ unità di pH. Per verificare che l'acqua di diluizione non alteri il risultato della prova (ad esempio per complessazione della sostanza chimica in esame), si dovrebbero prelevare e analizzare campioni a vari intervalli. La misurazione dei metalli pesanti (ad esempio Cu, Pb, Zn, Hg, Cd e Ni) dei principali anioni e cationi (ad esempio Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- e SO_4^{2-}), dei pesticidi (ad esempio pesticidi organofosforati totali e organoclorurati totali), del carbonio organico totale e dei solidi in sospensione va effettuata ad esempio ogni tre mesi, se l'acqua di diluizione è di qualità relativamente costante. Se la qualità dell'acqua si è dimostrata costante per almeno un anno, le titolazioni possono essere effettuate con minore frequenza (ad esempio ogni sei mesi). Alcune caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione accettabile sono elencate nell'appendice 3.

Soluzioni di prova

15. Le soluzioni di prova alle concentrazioni scelte vanno preparate per diluizione di una soluzione madre. La soluzione madre deve essere di preferenza preparata semplicemente miscelando o agitando la sostanza chimica in esame nell'acqua di diluizione con mezzi meccanici (cioè agitazione o ultrasuoni). Per ottenere una concentrazione adeguata della soluzione madre si possono utilizzare colonne di saturazione (colonne di solubilità). L'uso di un mezzo disperdente con solvente non è raccomandato, ma può rivelarsi necessario. In tal caso, è necessario testare in parallelo una vasca di controllo contenente la stessa concentrazione di solvente delle vasche contenenti la sostanza chimica in esame. Per sostanze chimiche difficili da testare, un solvente può essere la migliore soluzione tecnica; a tal fine si dovrebbe consultare il documento d'orientamento dell'OCSE sulle prove di tossicità in ambiente acquatico di sostanze o miscele "difficili" (22). La scelta del solvente è determinata dalle proprietà chimiche della sostanza. Il documento di orientamento dell'OCSE raccomanda di non superare una concentrazione massima di $100\mu\text{l/l}$. Tuttavia un recente studio (23) ha dimostrato che l'uso di solventi durante le prove sulle sostanze attive sul sistema endocrino può generare preoccupazioni di altro tipo. Se è necessario usare un solvente, si raccomanda pertanto di ridurre la concentrazione al minimo tecnicamente possibile (che dipende dalle proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica in esame).
16. Va utilizzato un sistema sperimentale a flusso continuo che eroga e diluisce in modo continuato la soluzione madre della sostanza chimica in esame (ad esempio, pompa dosatrice, diluitore proporzionale, sistema di saturazione) per fornire le concentrazioni di prova nelle vasche sperimentali. La portata della soluzione madre e dell'acqua di diluizione dovrebbe essere controllata periodicamente, preferibilmente ogni giorno, e non dovrebbe variare di oltre il 10 % per tutta la durata della prova. Occorre evitare l'utilizzo di tubi in plastica di cattiva qualità o altri materiali che possano contenere sostanze biologicamente attive. Ai fini della selezione del materiale per il sistema a flusso continuo va preso in considerazione l'adsorbimento della sostanza chimica in esame rispetto a tale materiale.

Mantenimento dei pesci

17. I pesci vanno selezionati da una popolazione allevata in laboratorio, preferibilmente dallo stesso ceppo, che sia stata acclimatata per almeno due settimane prima della sperimentazione in condizioni di qualità dell'acqua e di illuminazione simili a quelle usate durante la prova. È importante che il tasso di carico e la densità della popolazione (cfr. definizioni nell'appendice 1) siano adeguati per la specie utilizzata ai fini della prova (cfr. appendice 2).
18. Dopo un periodo di ambientazione di 48 ore, si registra la mortalità e si applicano i seguenti criteri:
 - mortalità superiore al 10 % della popolazione in sette giorni: l'intero lotto viene respinto;
 - mortalità fra il 5 % e il 10 % della popolazione: acclimatazione per altri sette giorni; se nel corso della seconda settimana la mortalità supera il 5 %, respingere l'intero lotto;
 - mortalità inferiore al 5 % della popolazione in sette giorni: accettare il lotto.
19. I pesci non devono essere sottoposti a trattamenti per patologie durante i periodi di acclimatazione, pre-esposizione ed esposizione.

Pre-esposizione e selezione dei pesci

20. Si raccomanda una settimana di pre-esposizione, durante la quale i pesci rimangono in vasche simili a quelle della prova. I pesci vanno nutriti *ad libitum* durante tutto il periodo di acclimatazione e di esposizione. La fase di esposizione ha inizio con l'utilizzo di adulti sessualmente dimorfici provenienti da una popolazione allevata in laboratorio di animali sessualmente maturi (aventi, ad esempio nel caso dei ciprinidi e dei medaka, caratteri sessuali secondari visibili a occhio nudo), che si riproducono attivamente. A titolo di orientamento generale (che non può però essere considerato indipendentemente dall'osservazione dello stato riproduttivo dell'intero lotto), i ciprinidi dovrebbero avere un'età di circa 20 (± 2) settimane, a condizione di essere stati allevati a una temperatura di 25 ± 2 °C durante l'intera vita; i medaka dovrebbero avere un'età di circa 16 (± 2) settimane, a condizione di essere stati sempre allevati ad una temperatura di 25 ± 2 °C, mentre i pesci-zebra dovrebbero avere un'età di circa 16 (± 2) settimane, se allevati ad una temperatura di 26 ± 2 °C.

DISEGNO SPERIMENTALE

21. Sono utilizzate tre concentrazioni della sostanza chimica in esame e una vasca (contenente acqua) di controllo; se necessario un'altra vasca di controllo con solvente. I dati possono essere analizzati per determinare le differenze statisticamente significative tra le risposte corrispondenti a ciascuna concentrazione e al controllo. Tali analisi non servono a valutare i rischi, quanto a determinare se è necessario sottoporre la sostanza chimica in esame a ulteriore sperimentazione per stabilire potenziali effetti negativi a più lungo termine (sopravvivenza, sviluppo, crescita e riproduzione (24)).
22. Per i pesci zebra e i medaka, il 21° giorno di sperimentazione vengono prelevati campioni nei gruppi trattati per ciascun livello di concentrazione (5 maschi e 5 femmine in ciascuno delle due repliche) e nel gruppo (o nei gruppi) di controllo ai fini della misurazione della vitellogenina e della valutazione dei caratteri sessuali secondari, se del caso. Per i ciprinidi il 21° giorno vengono prelevati campioni nei gruppi trattati per ciascun livello di concentrazione (2 maschi e 4 femmine in ciascuno delle due repliche) e nel gruppo (o nei gruppi) di controllo ai fini della misurazione della vitellogenina e della valutazione dei caratteri sessuali secondari.

Selezione delle concentrazioni sperimentali

23. Ai fini della prova la concentrazione massima è fissata al livello della concentrazione massima tollerata (CMT), ottenuta mediante un *rangefinder* o altri dati relativi alla tossicità, oppure fissata a 10 mg/l, oppure determinata in funzione della solubilità massima in acqua, a seconda di quale sia il risultato più basso. La CMT è definita come la concentrazione massima della sostanza chimica in esame che comporti una mortalità inferiore al 10 %. L'applicazione di tale approccio presuppone l'esistenza di dati empirici sulla tossicità acuta o altri dati sulla tossicità a fronte dei quali la CMT possa essere stimata. La stima della CMT potrebbe essere inaccurata e richiede generalmente il giudizio professionale di un esperto.
24. Sono necessarie tre concentrazioni di prova, che differiscano di un fattore costante non superiore a 10, e una vasca di controllo con l'acqua di diluizione (più, se necessario, una vasca con solvente). Si raccomanda un intervallo dei fattori di distanza compreso tra 3,2 e 10.

PROCEDIMENTO**Selezione e pesatura dei pesci da sottoporre alla prova**

25. È importante ridurre al minimo la differenza di peso tra i pesci all'inizio della prova. L'appendice 2 fornisce gli intervalli adeguati delle dimensioni per le diverse specie raccomandate per questa prova. Se possibile, all'inizio del saggio, l'intervallo di peso di tutti i pesci maschi e femmine del lotto utilizzato deve essere mantenuta entro un margine di $\pm 20\%$ intorno alla media aritmetica di ciascun sesso. Si raccomanda di pesare un sottocampione di pesci prima della prova per stimare il peso medio.

Condizioni di esposizione*Durata*

26. La durata del test è di 21 giorni, preceduta da un periodo di pre-esposizione, la cui durata raccomandata è di una settimana.

Alimentazione

27. I pesci sono nutriti *ad libitum* con cibo adatto (appendice 2) in quantità sufficiente per mantenerli in buona condizione fisica. Occorre evitare la crescita microbica e l'intorbidimento dell'acqua. A titolo indicativo, la razione quotidiana può essere suddivisa in due o tre parti uguali somministrate più volte al giorno, con almeno tre ore d'intervallo. Un'unica razione maggiore è accettabile, in particolare durante il fine settimana. I pesci non vanno nutriti nelle 12 ore che precedono i prelievi/la necroscopia.
28. Il cibo somministrato ai pesci deve essere esaminato per individuare l'eventuale presenza di contaminanti [pesticidi organoclorurati, idrocarburi policiclici aromatici (IPA), policlorobifenili (PCB)]. Va evitata una dieta con un'alta concentrazione di fitoestrogeni, perché pregiudicherebbe la reazione della prova a un noto antagonista degli estrogeni (17-beta estradiolo).
29. Il cibo avanzato e il materiale fecale vanno rimossi dalle vasche almeno due volte alla settimana, ad esempio pulendo con cura il fondo di ciascuna vasca con un sifone.

Illuminazione e temperatura

30. Il fotoperiodo e la temperatura dell'acqua devono essere adatti alla specie utilizzata (appendice 2).

Frequenza delle determinazioni e delle misurazioni analitiche

31. Prima che inizi il periodo di esposizione, va verificato il buon funzionamento del sistema di distribuzione della sostanza chimica in esame. Vanno acquisiti tutti i metodi analitici necessari, comprese sufficienti conoscenze sulla stabilità della sostanza chimica nel sistema. Durante la prova, le concentrazioni della sostanza chimica in esame sono determinate a intervalli regolari verificando, preferibilmente ogni giorno ma almeno due volte alla settimana, la portata del diluente e della soluzione madre della sostanza tossica. Tale portata non deve variare di oltre il 10 % per tutta la durata del test. Si raccomanda di misurare le effettive concentrazioni della sostanza chimica in esame in ciascuna vasca all'inizio della prova e successivamente una volta alla settimana.
32. Si raccomanda che i risultati siano basati sulle concentrazioni misurate. Tuttavia, se la concentrazione della sostanza chimica in esame in soluzione è stata adeguatamente mantenuta nel corso dell'intera prova in un intervallo di $\pm 20\%$ della concentrazione nominale, i risultati possono essere calcolati a partire dai valori nominali o misurati.
33. Può essere necessario filtrare (ad esempio utilizzando membrane con pori di 0,45 μm) o centrifugare i campioni; in tal caso la procedura raccomandata è la centrifugazione. Se però è dimostrato che la sostanza chimica in esame non adsorbe sui filtri, è accettabile anche la filtrazione.

34. Durante la prova, l'ossigeno dissolto, la temperatura e il pH sono misurati in tutte le vasche almeno una volta alla settimana. La durezza totale e l'alcalinità sono misurate almeno una volta alla settimana nelle vasche di controllo e in una vasca con la massima concentrazione. È auspicabile che la temperatura sia controllata continuamente almeno in una vasca sperimentale.

Osservazioni

35. Alcune risposte biologiche generali (ad es. sopravvivenza) e mirate (ad es. livelli di vitellogenina) sono valutate nel corso o al termine della prova. La misurazione e la valutazione di questi parametri e la loro utilità sono descritti più sotto.

Sopravvivenza

36. Occorre esaminare i pesci quotidianamente durante la prova. Eventuali casi di mortalità vanno registrati e i pesci morti rimossi dalla vasca quanto prima possibile. Gli esemplari morti non devono essere sostituiti né nelle vasche di controllo né in quelle di sperimentazione. Il sesso degli esemplari morti durante la prova è determinata mediante osservazione macroscopica delle gonadi.

Comportamento e aspetto

37. Deve essere annotato qualsiasi comportamento anomalo (rispetto ai controlli), che può comprendere segnali indicativi di una tossicità generale, quali iperventilazione, movimenti natatori scoordinati, perdita di equilibrio, inattività o alimentazione atipiche). Occorre inoltre rilevare le eventuali anomalie esterne (quali emorragie, decolorazione). Tali segnali di tossicità vanno valutati con prudenza in sede di interpretazione dei dati poiché potrebbero indicare concentrazioni alle quali i biomarcatori di potenziali effetti sul sistema endocrino non sono affidabili. Le osservazioni sul comportamento possono inoltre fornire informazioni qualitative utili per giustificare potenziali requisiti futuri in materia di sperimentazione sui pesci. Ad esempio è stata osservata un'aggressività territoriale nei maschi normali o nelle femmine mascolinizzate dei ciprinidi a seguito di esposizione ad androgeni. Nei pesci zebra, il caratteristico comportamento di accoppiamento e riproduzione dopo le prime luci dell'alba è ridotto o ostacolato dall'esposizione agli estrogeni o agli antiandrogeni.
38. Poiché la manipolazione dei pesci potrebbe alterare rapidamente alcune caratteristiche fisiche (segnatamente il colore), occorre procedere ad osservazioni qualitative prima di rimuovere i pesci dal sistema sperimentale. Le esperienze finora effettuate sui ciprinidi indicano che alcune sostanze che agiscono sul sistema endocrino possono inizialmente alterare le seguenti caratteristiche esterne: colore della livrea (chiaro o scuro), motivi ricorrenti nella colorazione (presenza di strisce verticali) e forma del corpo (regione della testa e regione toracica). Le osservazioni relative alle caratteristiche fisiche dei pesci vanno pertanto valutate nel corso e al termine della prova.

Soppressione incruenta

39. Il 21° giorno, vale a dire alla fine del periodo di esposizione, i pesci vengono soppressi con idonei quantitativi di tricaina [metan sulfonato di tricaina (MS 222) (CAS 886-86-2)] in soluzione di 100-500 mg/l tamponata con 300 mg/l NaHCO₃ (bicarbonato di sodio, CAS 144-55-8) per ridurre l'irritazione della mucosa; prelievi di sangue o di tessuto sono quindi effettuati per la determinazione della vitellogenina (cfr. sezione sulla vitellogenina).

Osservazione dei caratteri sessuali secondari

40. Determinate sostanze chimiche che agiscono sul sistema endocrino possono indurre alterazioni dei caratteri sessuali secondari specializzati (numero di tubercoli nuziali nei ciprinidi maschi e processi papillari nei medaka maschi). Segnatamente, sostanze che presentano particolari meccanismi di azione possono determinare la comparsa anomala di caratteri sessuali secondari in animali del sesso opposto. Ad esempio, antiandrogeni quali trenbolone, metiltestosterone e diidrotestosterone, possono provocare l'insorgere di tuberi nuziali sporgenti nei ciprinidi femmina e di processi papillari nei medaka femmina (11, 20, 21). È stato inoltre segnalato che antagonisti dei recettori degli estrogeni possono ridurre il numero dei tubercoli nuziali e le dimensioni dell'ispessimento situato tra nuca e dorso degli adulti maschi di ciprinidi (25, 26). Tali osservazioni morfologiche grossolane possono fornire informazioni qualitative e quantitative utili per giustificare potenziali requisiti futuri in materia di sperimentazione sui pesci. Il numero e le dimensioni dei tubercoli nuziali nei ciprinidi nonché quelli dei processi papillari nei medaka possono essere quantificati direttamente, o più comodamente, su esemplari non soggetti a test. Le procedure raccomandate per la valutazione dei caratteri sessuali secondari dei ciprinidi e dei medaka figurano rispettivamente nell'appendice 5A e appendice 5B.

Vitellogenina (VTG)

41. Un campione di sangue è prelevato dall'arteria/ vena caudale mediante un tubo capillare ematocrito con eparina, o in alternativa mediante puntura cardiaca effettuata con siringa. In funzione della dimensione del pesce, i volumi di sangue prelevati sono generalmente di 5-60 µl per individuo nei ciprinidi e 5-15 µl per individuo nel danio zebro. Il plasma è separato dal sangue mediante centrifugazione prima di essere conservato con inibitori di proteasi a – 80 °C fino all'analisi per la determinazione della vitellogenina. Per contro, nei medaka è utilizzato un prelievo epatico e nel danio zebro può essere impiegato un omogenato testa/coda come campione tissutale per la determinazione della vitellogenina (appendice 6). La misurazione della VTG è basato su un metodo ELISA omologo convalidato utilizzando anticorpi omologhi e uno standard VTG omologo. Si raccomanda di utilizzare un metodo in grado di individuare concentrazioni di VTG molto basse (fino a pochi ng/ml di plasma o ng/mg di tessuti), corrispondenti al livello generale nei pesci maschi non soggetti ad esposizione.
42. Il controllo della qualità dell'analisi della vitellogenina sarà condotto mediante l'applicazione di standard, prove in bianco e almeno una duplicazione delle analisi. Per ciascun metodo ELISA va effettuato un test sull'effetto della matrice (effetto di diluizione del campione) per determinare il fattore minimo di diluizione del campione. Ciascuna piastra ELISA utilizzata per la determinazione della VTG deve comprendere i seguenti campioni di controllo della qualità: almeno sei standard di calibrazione che coprono l'intervallo di concentrazioni di vitellogenina attese e almeno una prova in bianco di collegamento non specifica (analisi in doppio). L'assorbanza delle prove in bianco è inferiore al 5 % dell'assorbanza massima degli standard di calibratura. Sono analizzate almeno due aliquote (pozzetti in doppio) di ciascuna diluizione del campione. I pozzetti in doppio che differiscono di oltre il 20 % sono sottoposti a una nuova analisi.
43. Il coefficiente di correlazione (R^2) delle curve di calibrazione deve essere superiore a 0,99. Tuttavia una correlazione elevata non è sufficiente a garantire una previsione adeguata della concentrazione per tutti gli intervalli. Oltre ad ottenere una correlazione sufficientemente elevata per la curva di calibrazione, la concentrazione di ciascuno standard, calcolato a partire dalla curva di calibrazione, deve essere compresa tra 70 e 120 % della concentrazione nominale. Se le concentrazioni nominali tendono ad allontanarsi dalla retta di regressione della calibrazione (a concentrazioni inferiori, ad esempio), può essere necessario dividere la curva di calibrazione in due gruppi di intervalli, uno alto e uno basso, o utilizzare un modello non lineare per adattare i dati relativi all'assorbanza. Se la curva è divisa, i due segmenti di retta devono avere un coefficiente di correlazione $R^2 > 0,99$.
44. Il limite di rilevazione (LOD) è definito come il limite al di sotto del quale la concentrazione è troppo bassa perché la sostanza sia individuata, e il limite di quantificazione (LOQ) è definito come il limite al di sotto del quale la concentrazione è troppo bassa perché la sostanza sia individuata, moltiplicato per il coefficiente di diluizione più basso.
45. Ciascun giorno in cui è effettuata l'analisi della vitellogenina, è analizzato un campione fortificato ottenuto a partire da uno standard di riferimento inter-prova (appendice 7). Il rapporto tra la concentrazione prevista e la concentrazione misurata verrà quindi annotato sistematicamente assieme ai risultati dei singoli test eseguiti nello stesso giorno.

DATI E RELAZIONE**Valutazione delle risposte dei biomarcatori mediante l'analisi della varianza (ANOVA)**

46. Per individuare gli effetti potenziali di una sostanza chimica sul sistema endocrino, si confrontano le risposte dei gruppi trattati e del gruppo di controllo mediante l'analisi della varianza (ANOVA). Se si utilizza un controllo contenente solvente, va effettuata un'adeguata analisi statistica del controllo con l'acqua di diluizione e del controllo contenente il solvente per ciascun endpoint. Si richiama la linea guida OCSE (2006C) (27) per gli orientamenti sul trattamento dei dati relativi al controllo con l'acqua di diluizione e col solvente nella successiva analisi statistica. Tutte le risposte biologiche ottenute vanno analizzate e valutate separatamente per ciascun sesso. Se non vengono soddisfatti i presupposti necessari per i metodi parametrici — distribuzione non normale (ad esempio al test di Shapiro-Wilk) o varianza eterogenea (al test di Bartlett o di Levene) — potrebbe essere necessario trasformare i dati per rendere omogenee le varianze prima di eseguire l'ANOVA oppure effettuare un'ANOVA ponderata. Il test (parametrico) di Dunnett per confronti multipli a coppia o il test (non parametrico) di Mann-Whitney con correzione di Bonferroni possono essere utilizzati per una relazione dose-risposta non monotono. Altri test statistici possono essere utilizzati (i test di Jonckheere-Terpstra o di Williams) se la relazione dose-risposta è approssimativamente monotona. L'appendice 8 riporta un diagramma di analisi statistica inteso ad aiutare la scelta del test statistico più appropriata. Il documento dell'OCSE sugli attuali metodi di analisi statistica dei dati sull'ecotossicità (27) fornisce ulteriori informazioni in materia.

Elaborazione di relazioni sui risultati della prova

47. I dati devono comprendere:

Infrastruttura utilizzata per la prova:

- personale responsabile dello studio e rispettive mansioni;
- ciascun laboratorio deve dimostrare di sapere utilizzare con adeguata competenza una serie di sostanze chimiche rappresentative.

Sostanza chimica in esame:

- caratterizzazione della sostanza chimica in esame;
- natura fisica e proprietà fisico-chimiche pertinenti;
- metodo e frequenza di preparazione delle concentrazioni sperimentali
- informazioni sulla stabilità e la biodegradabilità.

Solvente:

- caratterizzazione del solvente (natura, concentrazione impiegata);
- giustificazione della scelta del mezzo disperdente (se diverso dall'acqua).

Animali sperimentali

- specie e ceppo
- fornitore e stabilimento specifico del fornitore;
- età dei pesci all'inizio della prova e loro stato riproduttivo;
- informazioni dettagliate sulla procedura di acclimatazione degli animali;
- peso del pesce all'inizio dell'esposizione (calcolato a partire da un sottocampione proveniente dalla popolazione di pesci).

Condizioni sperimentali:

- metodo di prova utilizzato (tipo di prova, carico, densità della popolazione, ecc.);
- metodo di preparazione delle soluzioni madre e loro portata;
- concentrazioni nominali di prova, misurazione settimanale delle concentrazioni delle soluzioni di prova e metodo analitico utilizzato, medie dei valori misurati e loro deviazioni standard nelle vasche sperimentali e dimostrazione che le misure si riferiscono alle concentrazioni della sostanza chimica in esame in soluzione vera;
- caratteristiche dell'acqua di diluizione (pH, durezza, alcalinità, temperatura, concentrazione di ossigeno dissolto, livelli di cloro residuo, carbonio organico totale, solidi in sospensione e eventuali altre misurazioni effettuate),
- qualità dell'acqua nelle vasche sperimentali: pH, durezza, temperatura e concentrazione di ossigeno dissolto;
- informazioni dettagliate sull'alimentazione (per esempio tipo di mangime, provenienza, quantità somministrata e frequenza) e analisi di eventuali contaminanti pertinenti (PCB, IPA e pesticidi organoclorurati).

Risultati

- dimostrazione che i controlli soddisfano i criteri di validità della prova;
- dati sulla mortalità per ciascuna concentrazione di prova e ciascun controllo;
- Tecniche di analisi statistica utilizzate, trattamento dei dati e giustificazione delle tecniche usate;
- dati sulle osservazioni biologiche della morfologia macroscopica, compresi i caratteri sessuali secondari e la vitellogenina;
- risultati delle analisi di dati, presentati preferibilmente sotto forma di tabelle e grafici;
- incidenza delle eventuali reazioni anomale da parte dei pesci e di eventuali effetti visibili indotti dalla sostanza chimica in esame.

ORIENTAMENTI PER L'INTERPRETAZIONE E L'ACCETTAZIONE DEI RISULTATI

48. Questa sezione presenta alcune considerazioni che vanno tenute presenti ai fini dell'interpretazione dei risultati della prova per quanto riguarda i diversi parametri misurati. I risultati vanno interpretati con cautela nel caso in cui la sostanza chimica in esame sembri causare evidenti segni di tossicità o avere ripercussioni sullo stato generale dell'animale.
49. Nel determinare l'intervallo delle concentrazioni di prova, occorre fare attenzione a non superare la concentrazione massima tollerata per assicurare che i dati siano interpretati in modo attendibile. È importante che almeno uno dei trattamenti effettuati risulti nell'assenza di segnali di effetti tossici. I sintomi patologici e i segnali di tossicità devono fare l'oggetto di una valutazione e di una relazione dettagliata. È possibile, ad esempio, che la produzione di VTG nelle femmine sia compromessa anche dalla tossicità generale e dai meccanismi di azione tossica non connessi al sistema endocrino (epatotossicità, ad esempio). Tuttavia l'interpretazione degli effetti può essere rafforzata mediante altri livelli di trattamento i cui risultati non siano inficiati da tossicità sistemica.
50. Esistono alcuni parametri da considerare ai fini dell'accettazione dei risultati della prova. A titolo indicativo, i livelli di VTG vanno distinti nei gruppi di maschi e di femmine e devono essere separati da almeno tre ordini di grandezza nei ciprinidi e nel danio zebrato e di un ordine di grandezza nei medaka. Esempi della gamma dei valori rilevati nei gruppi di controllo e in ciascun gruppo di trattamento sono disponibili nelle relazioni di validazione (1, 2, 3, 4). Valori elevati di VTG nei maschi dei gruppi di controllo possono compromettere la prestazione del saggio e la capacità di individuare antagonisti degli estrogeni di bassa potenza. Valori bassi di VTG nelle femmine di controllo possono compromettere la prestazione della prova e la sua capacità di individuare inibitori dell'aromatasi e antagonisti degli estrogeni. Gli studi di validazione sono stati utilizzati per l'elaborazione di tali orientamenti.
51. Se un laboratorio non ha mai effettuato la prova in precedenza o se sono state introdotte modifiche significative (cambio di ceppo o di fornitore di pesci), si consiglia di effettuare uno studio per verificare la competenza tecnica. Si raccomanda di utilizzare sostanze che presentano una gamma di attività e di effetti su alcuni dei parametri misurati durante la prova. In pratica, ogni laboratorio deve essere invitato a fornire i propri dati di controllo storici per i maschi e le femmine, e ad effettuare una prova con una sostanza usata per i controlli positivi dell'attività estrogenica (ad esempio 17β -estradiol ng/l a 100 o un noto antagonista debole) che dia luogo ad un aumento della VTG nei maschi, una sostanza usata per i controlli positivi dell'inibizione dell'aromatasi (fadrozolo o procloraz a 300 μ g/l) con una conseguente diminuzione della VTG nelle femmine e una sostanza usata per i controlli positivi dell'attività androgenica (17β -trenbolone a 5 μ g/l, ad esempio) che dia luogo all'induzione di caratteri sessuali secondari nelle femmine dei ciprinidi e dei medaka. Tutti questi dati possono essere confrontati con i dati disponibili ricavati dagli studi di convalida (1, 2, 3) per garantire la competenza del laboratorio.
52. In generale, le misurazioni della vitellogenina vanno considerate positive in caso di aumento statisticamente significativo della VTG nei maschi ($p < 0,05$) o di una diminuzione statisticamente significativa nelle femmine ($p < 0,05$), almeno alla concentrazione massima testata rispetto al gruppo di controllo e in assenza di segni di tossicità generale. Un risultato positivo è inoltre confermato dalla dimostrazione di una relazione biologicamente plausibile della curva dose-risposta. Come già menzionato, il calo della vitellogenina può non essere interamente di origine endocrina; tuttavia, un risultato positivo va generalmente interpretato come una prova di attività del sistema endocrino *in vivo*, e dovrebbe generalmente indurre ad avviare attività volte a ottenere ulteriori chiarimenti.

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006)27.
- (2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006)29.
- (3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007)25.
- (4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. <http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> (accessed 18/09/08).

- (5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Unpublished report dated 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.
- (6) OECD, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008)21.
- (7) Sumpter and Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives;103 Suppl 7:173-8* Review.
- (8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.*
- (9) Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.*
- (10) Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences; 67(1):121-30.*
- (11) Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.*
- (12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.*
- (13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpster JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.
- (14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.*
- (15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131*
- (16) Rose J, Holbech H, Lindholst C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 β -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531-539.*
- (17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksøyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.*
- (18) Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang JI, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol 4:87-98.*
- (19) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immuno-sorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science 50:301-308.*
- (20) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.*

-
- (21) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23 (3):774-81.
 - (22) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris
 - (23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Aquatic Toxicology*, 76; pp.69–92.
 - (24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as “signposts,” not “traffic lights,” in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*; 114 Suppl 1:106-14.
 - (25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.
 - (26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve and G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 478-488.
 - (27) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54. ENV/JM/MONO (2006)18
 - (28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/MONO(2012)22

Appendice 1

Abbreviazioni e definizioni

Sostanza chimica: sostanza o miscela

CV: coefficiente di variazione

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*): prova di immunoassorbimento enzimatico

Tasso di carico: peso a umido dei pesci per volume di acqua

Densità della popolazione: numero di pesci per volume di acqua

VTG (Vitellogenina): lipo-glico-fosfo-proteina precursore delle proteine del tuorlo normalmente prodotta dalle femmine sessualmente attive di tutte le specie ovipare

HPG (Hypothalamic-pituitary-gonadal) Axis: asse ipotalamo-ipofisi-gonadi.

CMT: concentrazione massima tollerata, che rappresenta circa il 10 % della LC₅₀.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela saggiata seguendo il presente metodo di prova.

Appendice 2

Condizioni sperimentali per lo screening del sistema endocrino dei pesci

1. Specie raccomandata	Ciprinide (<i>Pimephales promelas</i>)	Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	Danio zebrato (<i>Danio rerio</i>)
2. Tipo di prova	A flusso continuo	A flusso continuo	A flusso continuo
3. Temperatura dell'acqua	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Qualità dell'illuminazione	Lampadine fluorescenti (ad ampio spettro)	Lampadine fluorescenti (ad ampio spettro)	Lampadine fluorescenti (ad ampio spettro)
5. Intensità luminosa	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux, o 50-100 ft-c (livelli ambientali di laboratorio)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux, o 50-100 ft-c (livelli ambientali di laboratorio)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux, o 50-100 ft-c (livelli ambientali di laboratorio)
6. Periodo di illuminazione (le transizioni alba / crepuscolo sono facoltative, ma non considerate necessarie)	16 ore di luce, 8 ore di oscurità	12-16 ore di luce, 12-8 ore di oscurità	12-16 ore di luce, 12-8 ore di oscurità
7. Tasso di carico	< 5 g per l	< 5 g per l	< 5 g per l
8. Volume della vasca sperimentale	10 l (minimo)	2 l (minimo)	5 l (minimo)
9. Volume della soluzione sperimentale	8 l (minimo)	1,5 l (minimo)	4 l (minimo)
10. Sostituzione del volume delle soluzioni sperimentali	Minimo 6 al giorno	Minimo 5 al giorno	Minimo 5 al giorno
11. Età degli organismi oggetto della prova	vedere paragrafo 20.	vedere paragrafo 20.	vedere paragrafo 20.
12. Peso umido approssimativo del pesce adulto (g)	femmine 1,5 ± 20 % maschi: 2,5 ± 20 %	femmine 0,35 ± 20 % maschi: 0,35 ± 20 %	femmine 0,65 ± 20 % maschi: 0,4 ± 20 %
13. Numero di pesci per vasca sperimentale	6 (2 maschi e 4 femmine)	10 (5 maschi e 5 femmine)	10 (5 maschi e 5 femmine)
14. Numero di trattamenti	= 3 (oltre ai controlli appropriati)	= 3 (oltre ai controlli appropriati)	= 3 (oltre ai controlli appropriati)
15. Numero di vasche per ciascun trattamento	4 minimo	2 minimo	2 minimo
16. Numero di pesci per concentrazione di prova	16 femmine adulte e 8 maschi (4 femmine e 2 maschi in ciascuna vasca di replica)	10 femmine adulte and 10 maschi (5 femmine e 5 maschi in ciascuna vasca di replica)	10 femmine adulte and 10 maschi (5 femmine and 5 maschi in ciascuna vasca di replica)

17. Regime alimentare	Adulti o naupli di artemia, vivi o congelati, due o tre volte al giorno (ad libitum), mangimi disponibili in commercio o una combinazione di questi elementi	Naupli di artemia due o tre volte al giorno (ad libitum), mangimi disponibili in commercio o una combinazione di questi elementi	Naupli di artemia due o tre volte al giorno (ad libitum), mangimi disponibili in commercio o una combinazione di questi elementi
18. Aerazione	Nessuna aerazione tranne se la concentrazione dell'ossigeno dissolto scende al di sotto del 60 % della salutazione dell'aria	Nessuna aerazione tranne se la concentrazione dell'ossigeno dissolto scende al di sotto del 60 % della salutazione dell'aria	Nessuna aerazione tranne se la concentrazione dell'ossigeno dissolto scende al di sotto del 60 % della salutazione dell'aria
19. Acqua di diluizione	Acqua di superficie o ricostituita o acqua di rubinetto non clorata, pulita	Acqua di superficie o ricostituita o acqua di rubinetto non clorata, pulita	Acqua di superficie o ricostituita o acqua di rubinetto non clorata, pulita
20. Periodo di pre-esposizione	7 giorni (raccomandato)	7 giorni (raccomandato)	7 giorni (raccomandato)
21. Durata dell'esposizione chimica	21 giorni	21 giorni	21 giorni
22. Parametri biologici valutati	sopravvivenza comportamento caratteri sessuali secondari VTG	sopravvivenza comportamento caratteri sessuali secondari VTG	sopravvivenza comportamento VTG
23. Criteri di validità della prova	Ossigeno dissolto >60 % del valore di saturazione; temperature media di 25 ± 2 °C; 90 % sopravvivenza dei pesci nei campioni di controllo; concentrazioni misurate della sostanza chimica in esame entro il 20 % dei valori medi misurati per ciascun livello di trattamento.	Ossigeno dissolto >60 % del valore di saturazione; temperature media di 24 ± 2 °C; 90 % sopravvivenza dei pesci nei campioni di controllo; concentrazioni misurate della sostanza chimica in esame entro il 20 % dei valori medi misurati per ciascun livello di trattamento.	Ossigeno dissolto >60 % del valore di saturazione; temperature media di 26 ± 2 °C; 90 % sopravvivenza dei pesci nei campioni di controllo; concentrazioni misurate della sostanza chimica in esame entro il 20 % dei valori medi misurati per ciascun livello di trattamento.

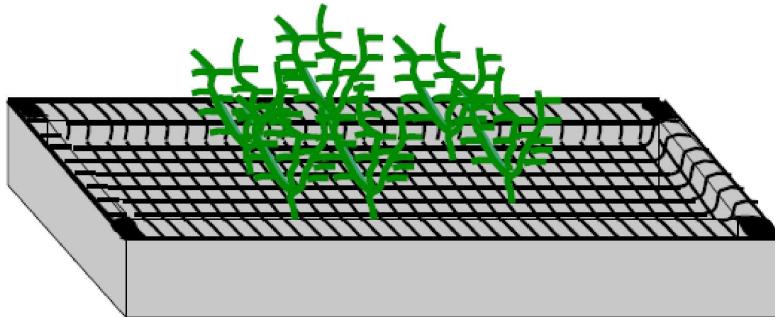
*Appendice 3***Alcune caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione accettabile**

Componente	Concentrazioni
Particolato	< 20mg/l
Carbonio organico totale	< 2mg/l
Ammoniaca non ionizzata	< 1µg/l
Cloro residuo	< 10µg/l
Pesticidi organofosforati totali	< 50ng/l
Pesticidi organoclorurati totali più difenili policlorurati	< 50ng/l
Cloro organico totale	< 25 ng/l

Appendice 4A

Substrato di riproduzione per *danio rerio* (danio zebrato)

Piattaforma di riproduzione: Piatto per strumenti in vetro, ad esempio di dimensioni 22 × 15 × 5,5 (larghezza × L × h), coperto da una griglia amovibile di acciaio inossidabile (con maglie di 2 mm di larghezza). La griglia di copertura è posta ad un'altezza inferiore al bordo del piatto.



Il substrato di riproduzione è fissato sulla griglia, creando una struttura in cui i pesci possono muoversi. Allo scopo sono adatte, ad esempio, piante artificiali per acquario di plastica verde, (NB: bisogna tener presente il possibile adsorbimento della sostanza chimica in esame sulla materia plastica). La plastica è lisciviata in un volume sufficiente di acqua calda e per un tempo sufficiente affinché nessuna sostanza sia rilasciata nella soluzione di prova. Se si utilizzano materiali in vetro, bisogna assicurare che i pesci non si feriscano o siano impediti nei movimenti durante le attività più vigorose.

La distanza tra il piatto e la parete della vasca deve essere di almeno 3 cm affinché la riproduzione non avvenga al di fuori del piatto. Le uova depositate sul piatto passano attraverso la griglia e possono essere prelevate 45-60 minuti dopo l'inizio dell'illuminazione. Le uova traslucide non aderiscono e possono facilmente essere contate alla luce trasversale. In presenza di cinque femmine per vasca, il numero di uova deposte può essere considerato basso se inferiore o pari a 20 al giorno, medio se compreso tra 20 e 100, e alto se superiore a 100. Il piatto di riproduzione è rimosso, le uova raccolte e la piattaforma di riproduzione reintrodotta nella vasca sperimentale, il più tardi possibile in serata o di prima mattina. La reintroduzione della piattaforma deve avvenire entro un'ora al massimo, perché altrimenti il segnale del substrato di riproduzione può indurre singoli accoppiamenti e una riproduzione al di fuori dei tempi controllati. Se la situazione richiede una successiva introduzione della piattaforma di riproduzione, occorre attendere almeno nove ore dopo l'inizio dell'illuminazione. A quest'ora tarda della giornata, la deposizione delle uova non è più indotta.

Appendice 4B

Substrato di riproduzione per la specie *Pimephales promelas*

Due o tre piastrelle e piatti di riproduzione combinati in plastica/ceramica/vetro o acciaio inossidabile sono collocati in ciascuna vasca sperimentale (ad.es. un pezzo di grondaia di forma semicircolare grigia di 80 mm di lunghezza posto su una piastrella di metallo dotata di bordi rialzati, lunga 130 mm) (v. foto). È dimostrato che le piastrelle in PVC o in ceramica opportunamente trattate possono costituire idonei substrati di riproduzione (Thorpe *et al*, 2007).

Si raccomanda l'uso di piastrelle abrase per migliorarne l'aderenza. Il piatto è inoltre munito di uno schermo di protezione per impedire che i pesci abbiano accesso alle uova depositate sul fondo a meno che sia stata dimostrata che le uova aderiscono efficacemente al substrato di riproduzione utilizzato.



La base è progettata per contenere tutte le uova che non aderiscono alla superficie della piastrella e che ricadrebbero quindi sul fondo della vasca (o le uova depositate direttamente sulla base di plastica piatta). Tutti i substrati di riproduzione sono liscivati per almeno 12 ore in acqua di diluizione prima dell'uso.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, 81, 90–98

Appendice 5A

Valutazione dei caratteri sessuali secondari di *Pimephales promelas* ai fini dell'individuazione di determinate sostanze attive a livello endocrino

Sintesi

Nei ciprinidi adulti della specie *Pimephales promelas*, le caratteristiche fisiche che possono assumere rilevanza ai fini della sperimentazione sugli interferenti endocrini sono le seguenti: colore della livrea (chiaro/scuro), motivi di colorazione (presenza o assenza di bande verticali), forma del corpo (forma della testa e della regione toracica, distensione addominale) e caratteri sessuali secondari specifici della specie (numero e dimensioni dei tubercoli nuziali, dimensioni del cuscinetto dorsale e dell'ovopositore).

I tubercoli nuziali sono situati sulla testa (cuscinetto dorsale) nei maschi adulti riproduttori, e sono generalmente disposti in modo bilaterale e simmetrico (Jensen et al. 2001). Le femmine delle vasche di controllo e i giovani esemplari maschi e femmine non mostrano alcuno sviluppo di tubercoli (Jensen et al. 2001). È possibile individuare fino a otto singoli tubercoli attorno agli occhi e tra le narici degli esemplari maschi. I tubercoli più grandi e numerosi formano due linee parallele situate immediatamente al di sotto delle narici e sopra la bocca. In molti pesci si riscontrano gruppi di tubercoli sotto la mascella inferiore; vicino alla bocca se ne trova generalmente solo una coppia mentre la parte ventrale può comprendere fino a quattro tubercoli. Il numero di tubercoli raramente supera i 30 (range di 18-28; Jensen et al. 2001). I tubercoli più numerosi presentano un'unica struttura di forma tondeggiante, di altezza approssimativamente pari al raggio. Nella maggior parte dei maschi riproduttori, alcuni tubercoli sono talmente estesi e prominenti che è impossibile distinguerli gli uni dagli altri.

Alcuni tipi di interferenti endocrini possono provocare l'insorgere abnorme di caratteri sessuali secondari nel sesso opposto; pertanto, gli antagonisti dei recettori degli androgeni come il 17 β -metiltestosterone o il 17 β -trenbolone possono provocare l'insorgere di tubercoli nuziali nelle femmine di *Pimephales promelas* (ciprinidi) femmina (Smith, 1974; Anckley et al., 2001, 2003), mentre gli antagonisti dei recettori degli estrogeni possono ridurre il numero o la dimensione dei tubercoli nuziali nei maschi (Miles-Richardson et al., 1999; Harries et al., 2000).

Segue una descrizione della caratterizzazione dei tubercoli nuziali nei in *Pimephales promelas* (ciprinidi), basata sul protocollo sperimentale utilizzato dal laboratorio dell'Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti (Duluth, MN). I prodotti e/o le attrezzature specifiche possono essere sostituiti da materiali comparabili disponibili.

L'utilizzazione di una lente di ingrandimento munita di illuminazione o microscopio binoculare da dissezione con illuminazione (3x) consente un'osservazione ottimale. Si osserverà il pesce in posizione dorsale, con la parte anteriore davanti (testa verso l'osservatore):

- a) Collocare il pesce in una piccola capsula di Petri (100 mm di diametro), sul ventre, parte anteriore verso l'avanti. Regolare il mirino per individuare i tubercoli. Far rotolare delicatamente il pesce da un lato all'altro per individuare le zone in cui si trovano i tubercoli. Contare e classificare i tubercoli.
- b) Ripetere l'osservazione sulla parte ventrale della testa, dopo aver collocato nella capsula di Petri il pesce sul dorso, parte anteriore verso l'avanti.
- c) Le osservazioni non dovrebbero superare i 2 minuti per ciascun esemplare.

Conteggio e classificazione dei tubercoli

Sono state individuate sei aree specifiche per la valutazione della presenza e dello sviluppo di tubercoli in *Pimephales promelas* (ciprinidi) adulti. È stata creato un modello per definire la localizzazione dei tubercoli e la quantità di tubercoli presenti (cfr. parte finale della presente appendice). Va registrato il numero di tubercoli che possono essere classificati come segue in funzione delle loro dimensioni: 0-nullo; 1-presente; 2-esteso e 3-prominente per ciascun organismo (figura 1).

Classe 0: assenza di qualsiasi tubercolo. Classe 1-presente: un tubercolo che ha un unico punto di altezza quasi uguale al raggio (diametro). Classe 2-tubercolo esteso: individuato dal tessuto somigliante ad un asterisco, di solito con un'ampia base radiale con solchi che partono dal centro. L'altezza dei tubercoli è spesso più frastagliata ma può talvolta essere leggermente arrotondata. Classe 3-tubercolo prominente: generalmente abbastanza ampio, di forma arrotondata, con una struttura meno ben definita. Questi tubercoli si agglomerano talvolta fino a formare un'unica massa lungo una zona o più zone (B, C e D, si veda la descrizione qui sotto). Il colore e la forma sono simili alla classe 2, ma sono talvolta piuttosto indeterminati. Questo sistema di classificazione permette generalmente di ottenere un risultato globale di <50 in un maschio normale di controllo che presenta un numero di tubercoli compresi tra 18 e 20 (Jensen et al. 2001).

Figura 1



Alcuni pesci possono presentare più tubercoli di quelli risultanti dalle caselle del modello (cfr. appendice A) per una particolare zona. In tal caso, codici supplementari possono essere indicati all'interno, a destra o a sinistra della casella. Il modello non deve pertanto necessariamente presentarsi simmetrico. Un'altra tecnica per indicare i tubercoli pari o riuniti verticalmente lungo il piano orizzontale della bocca potrebbe consistere nell'indicare codici a 2 cifre in un'unica casella.

Aree di localizzazione:

A — Tubercoli situati attorno agli occhi. Localizzati in zona da dorsale a ventrale intorno al bordo anteriore dell'occhio. Più comunemente nei maschi testimoni maturi, assenti nelle femmine di controllo, generalmente in coppia (uno presso ciascun occhio) o singoli nelle femmine esposte a androgeni.

B — Tubercoli situati tra le narici (pori canali sensoriali). Nei maschi di controllo sono generalmente in coppia a livelli di sviluppo superiori (2-estesi o 3-prominenti). Assenti nelle femmine di controllo ma talvolta presenti nelle femmine esposte a androgeni.

C — Tubercoli situati immediatamente davanti alle narici, parallelamente alla bocca. Generalmente stesi o prominenti nei maschi di controllo maturi. Presenti o estesi nei maschi e nelle femmine esposte a androgeni.

D — Tubercoli situati parallelamente alla bocca. Generalmente classificati come "sviluppati" nei maschi di controllo. Assenti nelle femmine di controllo ma presenti nelle femmine esposte a androgeni.

E — Tubercoli situati sulla mascella inferiore, vicino alla bocca, in genere di piccole dimensioni e a coppie. Variabili nei maschi di controllo o trattati e nelle femmine trattate.

F — Tubercoli situati nella zona ventrale verso E. Generalmente piccoli e a coppie. Presenti nei maschi di controllo e nelle femmine esposte a androgeni.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- (1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.
- (2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.
- (3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 34:3003-3011.
- (4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.

- (5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.
- (6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 47:129-145.
- (7) Smith RJF. 1974. Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can J Zool* 52:1031-1038.

Matrice dei tubercoli**Classificazione numerica**

ID _____

1- presente

Data _____

2-esteso

Punteggio totale _____

3-prominente

	A	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	B	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	C	X1								
	D	X1								

		E	X1	X1	
	F	X1	X1	X1	X1

Appendice 5B

Valutazione dei caratteri sessuali secondari nel medaka al fine di individuare alcune sostanze chimiche con attività endocrina

Di seguito è descritta la misurazione dei processi papillari (*), che costituiscono i caratteri sessuali secondari nel medaka (*Oryzias latipes*).

(*) I processi papillari sono generalmente presenti soltanto nei maschi adulti, e si situano tra il secondo e il settimo/ottavo raggio della pinna contando a partire dall'estremità posteriore della pinna anale (figure 1 e 2). Essi appaiono tuttavia raramente sul primo raggio contando a partire dall'estremità posteriore della pinna anale. La procedura operativa standard (POS) consente di misurare i processi presenti sul primo raggio della pinna (il numero del raggio si conta a partire dall'estremità posteriore della pinna anale nella presente POS).

- (1) Dopo l'escissione del fegato (appendice 6) la carcassa è introdotta in un tubo conico contenente circa 10 ml di formalina tamponata al 10 % (testa in alto, coda in basso). Se la gonade è fissata in una soluzione diversa dalla formalina tamponata al 10 %, praticare con un rasoio un taglio trasversale della carcassa tra la regione anteriore della pinna anale e l'ano, avendo cura di non rovinare il gonoporo e la gonade stessa (figura 3). Collocare la parte del corpo del pesce comprendente la testa nella soluzione fissativa per conservare la gonade, e la parte del corpo con la coda in formalina tamponata al 10 % come descritto sopra.
- (2) Dopo aver collocato il pesce in formalina tamponata al 10 %, afferrare con pinzette la regione anteriore della pinna anale e piegarla per una trentina di secondi affinché la pinna anale rimanga aperta. Tenendo la pinna anale con le pinzette, afferrare alcuni raggi della pinna nella regione anteriore avendo cura di non danneggiare i processi papillari.
- (3) Dopo aver tenuto la pinna anale aperta per una trentina di secondi, collocare il pesce in formalina tamponata al 10 % a temperatura ambiente fino alla misurazione dei processi papillari (la misurazione va effettuata dopo almeno 24 ore).

Misurazione

- (1) Dopo aver fissato il pesce in formalina tamponata al 10 % per almeno 24 ore, rimuovere la carcassa dal tubo conico e asciugare la formalina con carta da filtro (o carta assorbente).
- (2) Collocare il pesce con l'addome verso l'alto. Tagliare poi accuratamente la pinna anale con forbicine da dissezione (è preferibile tagliare la pinna anale con un pezzettino di pterigoforo).
- (3) Afferrare con le pinzette la regione anteriore della pinna anale asportata e disporla su un vetrino con qualche goccia d'acqua. Coprire quindi la pinna anale con un vetrino coprioggetti. Nell'afferrare la pinna anale con le pinzette, fare attenzione a non danneggiare i processi papillari.
- (4) Contare il numero di segmenti di raggio che presentano processi papillari utilizzando il contatore di un microscopio biologico (microscopio diritto o rovesciato). Si riconoscono i processi papillari quando è visibile una piccola formazione di processi papillari sul lato posteriore dei segmenti di raggio. Registrare in una tabella il numero di segmenti di raggio che presentano processi papillari in ciascun raggio di pinna (ad es. primo raggio: 0, secondo raggio: 10, terzo raggio: 12, ecc.) e registrare la somma in un foglio Excel per ciascun esemplare. Se necessario, fotografare la pinna anale e contare il numero di segmenti di raggio che presentano processi papillari sulla foto.
- (5) Dopo la misurazione, riporre la pinna anale nel tubo conico descritto al punto (1) e conservarla.

Figura 1

Differenze sessuali in base a forma e dimensioni della pinna anale. A: maschio; B: femmina. [Oka, T. B., (1931). Sui processi che avvengono sui raggi della pinna dell'esemplare maschio di *Oryzias latipes* e altri caratteri sessuali del pesce, cfr. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218].

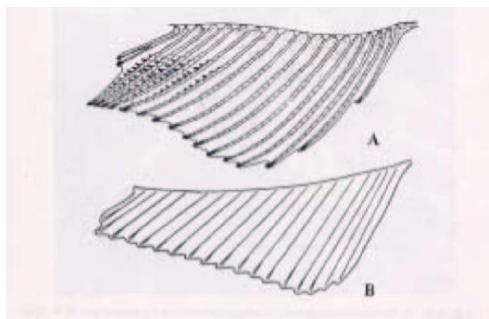


Figura 2

A: Processi che avvengono sui segmenti congiunti del raggio della pinna anale. J.P.: segmento congiunto; A.S.: spazio assiale; P.: processo. B: estremità distale della pinna anale. Gli attinotrichi (Act.) si trovano sulle punte. [Oka, T. B., (1931). Sui processi che avvengono sui raggi della pinna dell'esemplare maschio di *Oryzias latipes* e altri caratteri sessuali del pesce, cfr. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218].

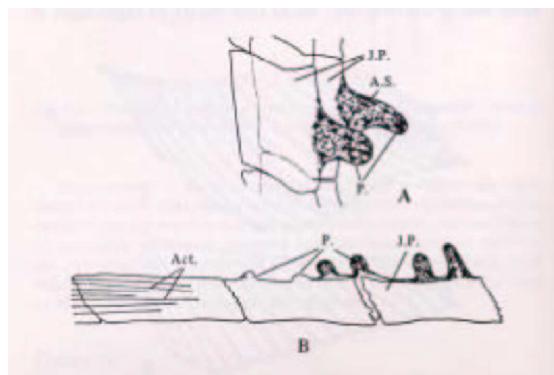
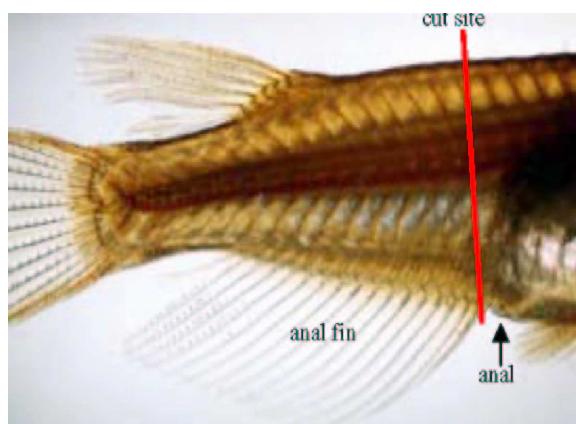


Figura 3

Fotografia del corpo del pesce che mostra la linea di taglio quando la gonade è fissata in una soluzione diversa dalla formalina tamponata al 10 %. In tal caso, il resto del corpo è tagliato fra la regione anteriore della pinna anale e l'ano mediante rasoio (linea rossa). La testa è riposta nella soluzione fissativa per conservare la gonade, e la coda in formalina tamponata al 10 %.



Appendice 6

Procedure raccomandate per i prelievi effettuati ai fini dell'analisi della vitellogenina

Si avrà cura di evitare la contaminazione incrociata tra i campioni di VTG dei maschi e delle femmine.

Procedura 1A: Ciprinidi della specie *Pimephales promelas*, prelievo di sangue dall'arteria/vena caudale

Dopo anestesia, il peduncolo caudale è parzialmente reciso con un bisturi ed è prelevato un campione di sangue dall'arteria/vena caudale mediante un tubo capillare per microematocrito eparinato. Dopo il prelievo di sangue, il plasma viene rapidamente separato tramite centrifugazione a temperatura ambiente per 3 minuti a 15 000 g (o a una temperatura di 4 °C per 10 minuti a 15 000 g). A seguito della centrifugazione, si può determinare la percentuale di ematocrito. Il plasma viene successivamente ritirato dal tubo microematocrito e immagazzinato in un tubo da centrifuga con 0,13 unità di aprotinina (un inibitore di proteasi) a -80 °C fino alla misurazione della vitellogenina. Secondo la dimensione del Ciprinide (che dipende dal sesso), i volumi di plasma prelevabili sono generalmente di 5-60 ml per individuo (Jensen et al. 2001).

Procedura 1B: Ciprinidi della specie *Pimephales promelas*, prelievo di sangue mediante puntura cardiaca

In alternativa, è possibile effettuare un prelievo di sangue con puntura cardiaca mediante siringa eparinizzata (1 000 unità di eparina per ml). Il sangue è trasferito in provette Eppendorf (mantenute nel ghiaccio) e quindi centrifugato (5 minuti a 7 000 g a temperatura ambiente). Il plasma va trasferito in provette Eppendorf pulite (in varie porzioni se il volume di plasma lo consente) e successivamente congelato rapidamente a -80°C fino all'analisi (Panter et al., 1998).

Procedura 2A: Escissione del fegato in *Oryzias latipes* (medaka)

Rimozione dei pesci oggetto di prova dalla vasca sperimentale

- (1) I pesci oggetto della prova sono rimossi dalla vasca sperimentale mediante un retino. Si faccia attenzione a non far cadere i pesci in un'altra vasca sperimentale.
- (2) In linea di principio, i pesci oggetto della prova vanno rimossi nell'ordine seguente: esemplari di controllo, vasca di controllo contenente il solvente (se del caso), concentrazione minima, concentrazione media, concentrazione massima e controllo positivo. Inoltre, tutti i maschi vanno rimossi dalla vasca sperimentale prima delle femmine.
- (3) Il sesso di ogni esemplare di prova è identificato in base ai caratteri sessuali secondari esterni (forma della pinna anale, ad esempio).
- (4) Collocare i pesci in un contenitore per il trasporto fino alla postazione di lavoro per l'escissione del fegato. Verificare le etichette della vasca sperimentale e del contenitore di trasporto a fini di accuratezza e per confermare che il numero di pesci rimossi dalla vasca sperimentale e il numero di pesci rimasti nella vasca sperimentale corrispondano alle previsioni.
- (5) Se il sesso non può essere identificato tramite l'aspetto esterno del pesce, rimuovere tutti i pesci dalla vasca sperimentale. In tal caso, il sesso è identificato mediante osservazione della gonade o i caratteri sessuali secondari mediante microscopio stereoscopico.

Escissione del fegato

- (1) Trasferire il pesce oggetto della prova dal contenitore di trasporto alla soluzione anestetica mediante retino.
- (2) Dopo l'anestesia, i pesci oggetto della prova sono trasferiti sulla carta da filtro (o carta assorbente) con pinzette (di tipo comune). Nell'afferrare i pesci, applicare le pinzette ai lati della testa per evitare di rompere la coda.
- (3) Asciugare l'acqua dalla superficie del pesce oggetto della prova sulla carta da filtro (o carta assorbente).
- (4) Porre i pesci sul dorso. Praticare quindi una piccola incisione trasversale tra la regione ventrale della nuca e la regione centrale dell'addome mediante forbici da dissezione.

- (5) Introdurre le forbici da dissezione nella piccola incisione, e praticare un'incisione lungo la linea mediana dell'addome, da un punto caudale rispetto al manto branchiale fino al lato cranico dell'ano. Fare attenzione a non introdurre le forbici da dissezione troppo in profondità per non rovinare il fegato e la gonade.
- (6) Svolgere le seguenti operazioni al microscopio stereoscopico.
- (7) Porre i pesci sul dorso sulla carta assorbente (o in una capsula di Petri di vetro o su una piastra di vetro).
- (8) Allargare le pareti della cavità addominale mediante pinzette di precisione ed esporre gli organi interni. È anche possibile esporre gli organi interni eliminando una delle pareti della cavità addominale se necessario.
- (9) Esporre la parte di collegamento tra il fegato e la cistifellea utilizzando un altro paio di pinzette di precisione. Afferrare quindi il dotto biliare e recidere la cistifellea, facendo attenzione a non romperla.
- (10) Afferrare l'esofago e asportare il tratto gastrointestinale dal fegato con lo stesso metodo. Fare attenzione a non far colare il contenuto del tratto gastrointestinale. Recidere il tratto gastrointestinale caudale dall'ano e rimuoverlo dalla cavità addominale.
- (11) Eliminare la massa dei tessuti adiposi ed altri tessuti situati alla periferia del fegato, avendo cura di non rovinare il fegato.
- (12) Afferrare la zona della porta epatica con le pinzette di precisione e rimuovere il fegato dalla cavità addominale.
- (13) Porre il fegato sulla piastra di vetro. Con le pinzette di precisione, rimuovere eventuale altro tessuto adiposo o tessuto estraneo (rivestimento della parete addominale, ad esempio), se del caso, dalla superficie del fegato.
- (14) Pesare il fegato mediante una bilancia di precisione elettronica utilizzando come tara una microprovetta da 1,5 ml. Annotare il valore sul foglio di lavoro (precisione: 0,1 mg). Confermare le informazioni identificative sull'etichetta della microprovetta.
- (15) Chiudere il tappo della microprovetta contenente il fegato e conservarla su un supporto di raffreddamento (o un supporto ghiacciato).
- (16) Dopo ogni escissione di fegato, pulire gli strumenti di dissezione oppure sostituirli con strumenti puliti.
- (17) Rimuovere nello stesso modo il fegato da tutti i pesci presenti nel contenitore di trasporto.
- (18) Dopo l'escissione del fegato di tutti i pesci presenti nel contenitore (cioè tutti i maschi e tutte le femmine di una vasca sperimentale), porre tutti gli esemplari di fegato su supporti per tubi muniti di etichetta di identificazione e conservarli in congelatore. Se i fegati subiranno un pre-trattamento subito dopo l'escissione, gli esemplari devono essere trasportati fino alla postazione di lavoro più vicina in un supporto di raffreddamento (o un supporto ghiacciato).

Dopo l'escissione del fegato, la carcassa è pronta per la misurazione dei caratteri sessuali secondari.

Campioni

Conservare i campioni di fegato prelevati dai pesci oggetto di prova ad una temperatura $\leq -70^{\circ}\text{C}$ se non utilizzati per il pre-trattamento subito dopo l'escissione.

Figura 1

Praticare con le forbici un taglio nella parte anteriore delle pinne pettorali.

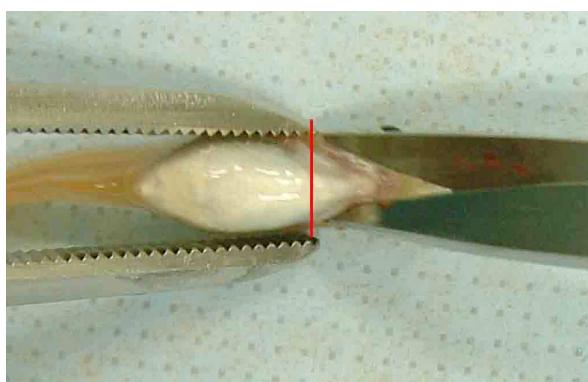
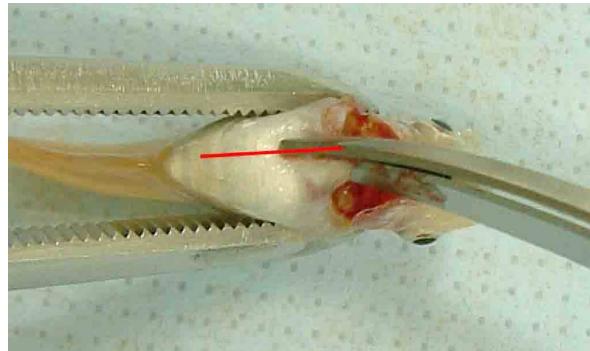


Figura 2

Tagliare la linea mediana dell'addome con forbici da un punto situato a circa 2 mm dal cranio fino all'ano.

*Figura 3*

Allargare le pareti addominali con pinzette per esporre il fegato e gli altri organi interni (in alternativa le pareti addominali possono essere pinzate lateralmente). La freccia mostra il fegato

*Figura 4*

Il fegato è dissezionato e rimosso mediante le pinzette.

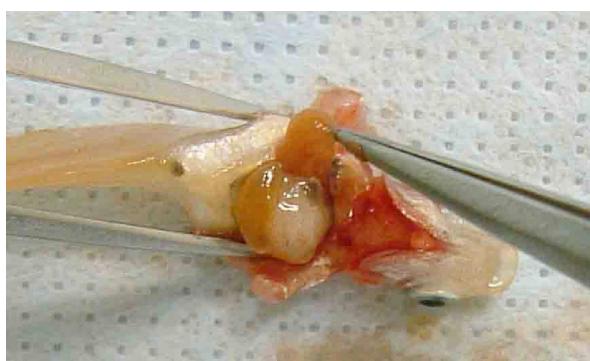


Figura 5

Gli intestini sono rimossi delicatamente con le pinzette.

*Figura 6*

Le due estremità degli intestini e gli attacchi del mesenterio sono separati con le forbici.

*Figura 7 (femmina)*

La procedura è identica per le femmine.



*Figura 8***Procedura completata.****Procedura 2B: Pre-trattamento del fegato per l'analisi della vitellogenina in *Oryzias latipes* (medaka)**

Ritirare la bottiglia contenente il tampone di omogeneizzazione dal kit ELISA e raffreddarlo con ghiaccio tritato (temperatura della soluzione: $\leq 4^{\circ}\text{C}$). Se si usa un tampone di omogeneizzazione proveniente da un kit EnBio ELISA, scongelare la soluzione a temperatura ambiente, e quindi raffreddare la bottiglia con ghiaccio tritato.

Calcolare il volume di tampone di omogeneizzazione per il fegato in base al peso di quest'ultimo (aggiungere 50 μl di tampone di omogeneizzazione per mg di fegato per l'omogenato). Per esempio: se il fegato pesa 4,5 mg, il volume del tampone di omogeneizzazione per il fegato è di 225 μl . Stilare un elenco dei volumi di tampone di omogeneizzazione per tutti i fegati.

Preparazione del fegato per il pre-trattamento

- (1) Ritirare la microprovetta da 1,5 ml contenente il fegato dal congelatore immediatamente prima del pre-trattamento.
- (2) Il pre-trattamento del fegato dei maschi è effettuato prima di quello delle femmine per evitare contaminazioni della vitellogenina. Inoltre, il pre-trattamento dei gruppi di prova è effettuata nel seguente ordine: controllo, vasca di controllo contenente il solvente (se del caso), concentrazione minima, concentrazione media, concentrazione massima e controllo positivo.
- (3) Il numero di microprovette da 1,5 ml contenenti i campioni epatici tolti dal congelatore in un dato momento non deve superare il numero di quelli che possono essere centrifugati subito.
- (4) Porre le microprovette da 1,5 ml contenenti i campioni epatici nel supporto ghiacciato secondo l'ordine di numerazione degli esemplari (non è necessario scongelare il fegato).

Svolgimento del pre-trattamento**1. Aggiunta del tampone di omogeneizzazione**

- (1) Verificare nell'elenco il volume di tampone di omogeneizzazione da utilizzare per un determinato campione di fegato e aggiustare la micropipetta (intervallo dei volumi: 100-1 000 μl) al volume adeguato. Attaccare un puntale pulito alla micropipetta.
- (2) Rimuovere il tampone di omogeneizzazione dalla bottiglia del reagente e aggiungere il tampone nella microprovetta da 1,5 ml contenente il fegato.
- (3) Aggiungere il tampone di omogeneizzazione in tutte le microprovette da 1,5 ml contenenti i campioni di fegato seguendo la procedura sopra descritta. Non è necessario sostituire il puntale della micropipetta con uno nuovo, a meno che non sia contaminato o si sospetti possa esserlo.

2. Omogeneizzazione del fegato

- (1) Attaccare un nuovo pestello di omogeneizzazione all'omogeneizzatore della microprovetta.
- (2) Introdurre il pestello nella microprovetta da 1,5 ml. Tenere l'omogeneizzatore in modo da pressare il fegato tra la superficie del pestello e la parete interna della microprovetta.
- (3) Attivare l'omogeneizzatore per 10-20 secondi. Raffreddare la microprovetta con ghiaccio tritato durante l'operazione.
- (4) Ritirare il pestello dalla microprovetta e lasciar riposare per una decina di minuti. Procedere quindi a un'ispezione visiva dello stato della sospensione.
- (5) Se si osservano pezzi di fegato nella sospensione, ripetere le operazioni (3) e (4) per ottenere un omogenato epatico soddisfacente.
- (6) Conservare al fresco l'omogenato epatico in sospensione nel supporto ghiacciato fino alla sua centrifugazione.
- (7) Utilizzare un pestello nuovo per ciascun omogenato.
- (8) Omogeneizzare tutti i fegati con tampone di omogeneizzazione seguendo la procedura sopra descritta.

3. Centrifugazione dell'omogenato epatico in sospensione

- (1) Verificare che la temperatura della centrifuga refrigerata sia $\leq 5^{\circ}\text{C}$.
- (2) Introdurre le microprovette da 1,5 ml contenenti l'omogenato epatico in sospensione nella centrifuga refrigerata (riequilibrare se necessario).
- (3) Centrifugare l'omogenato epatico in sospensione per 10 minuti a 13 000 g ad una temperatura $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Tuttavia, se i supernatanti sono adeguatamente separati, la forza centrifuga e la durata di centrifugazione possono essere adeguate come necessario.
- (4) Dopo la centrifugazione, verificare che i supernatanti siano adeguatamente separati (superficie: lipidi, strato intermedio: supernatante, strato inferiore: tessuto epatico). Se la separazione non è adeguata, ripetere la centrifugazione della sospensione alle stesse condizioni.
- (5) Rimuovere tutti i campioni dalla centrifuga refrigerata e trasferirli nel supporto ghiacciato secondo l'ordine di numerazione degli esemplari. Prestare attenzione a non rimettere in sospensione gli strati separati dopo la centrifugazione.

4. Raccolta del supernatante

- (1) Riporre quattro microprovette da 0,5 ml per la conservazione del supernatante nel supporto per provette.
- (2) Raccogliere 30 μl di ciascun supernatante (che forma lo strato intermedio dopo la separazione) con la micropipetta e versarli in una microprovetta da 0,5 ml, avendo cura di non raccogliere i lipidi dalla superficie o il tessuto epatico dal fondo.
- (3) Raccogliere il supernatante e versarlo in altri due microprovette da 0,5 ml seguendo la procedura sopra descritta.
- (4) Raccogliere il resto del supernatante con la micropipetta (se possibile: $\geq 100 \mu\text{l}$). Versare quindi il supernatante nella rimanente microprovetta da 0,5 ml, avendo cura di non raccogliere i lipidi dalla superficie o il tessuto epatico dal fondo.
- (5) Tappare la microprovetta da 0,5 ml e registrare il volume del supernatante sull'etichetta. Trasferire immediatamente le microprovette sul supporto ghiacciato.
- (6) Sostituire il puntale della micropipetta con uno nuovo per ciascun supernatante. Se una grande quantità di grassi rimane attaccata al puntale, sostituirlo immediatamente con uno nuovo per evitare la contaminazione dell'estratto di fegato con il grasso.

- (7) Versare tutto il supernatante centrifugato in quattro microprovette da 0,5 ml seguendo la procedura sopra descritta.
- (8) Dopo aver versato il supernatante nelle microprovette da 0,5 ml, riporle tutte sul relativo supporto con l'etichetta di identificazione e inserirle immediatamente nel congelatore. Se le concentrazioni di VTG sono misurate subito dopo il pre-trattamento, conservare al fresco una microprovetta da 0,5 ml (contenente 30 µl di supernatante) nel relativo supporto e trasferirla alla postazione di lavoro in cui sarà condotta l'analisi ELISA. In tal caso, riporre le microprovette rimanenti nei supporti e metterle nel congelatore.
- (9) Dopo la raccolta del supernatante, eliminare il liquido residuale in modo adeguato.

Conservazione degli esemplari

Conservare le microprovette da 0,5 ml contenenti il supernatante dell'omogenato epatico a una temperatura $\leq -70^{\circ}\text{C}$ fino all'esecuzione dell'analisi ELISA.

Procedura 3A: Prelievo di campioni ematici dall'arteria/ vena caudale nel danio zebbrato

Immediatamente dopo l'anestesia sezionare trasversalmente il peduncolo caudale ed eseguire un prelievo ematico dall'arteria/ vena caudale mediante tubo capillare microematocrito eparinato. I volumi di sangue raccolti variano tra 5 e 15 µl in funzione della dimensione del pesce. Un volume equivalente di tampone di aprotinina [6 µg/ml di soluzione salina tamponata al fosfato (PB)] è aggiunto al capillare e il plasma è separato dal sangue mediante centrifugazione (5 minuti a 600 g). Il plasma è raccolto in provette e conservato a -20 C fino alla misurazione della vitellogenina o di altre proteine di interesse.

Procedura 3B: Prelievo di sangue mediante puntura cardiaca nel danio zebbrato

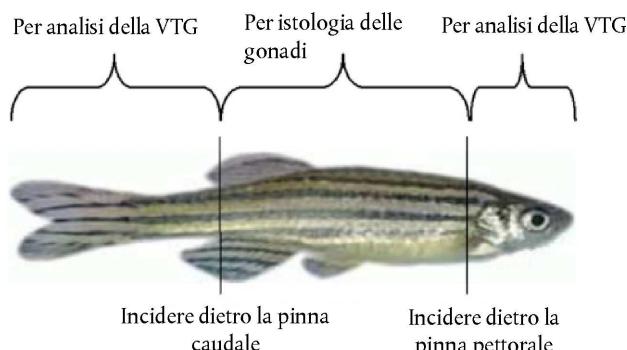
Per evitare la coagulazione del sangue e la degradazione della proteina, i campioni sono prelevati in una soluzione salina tamponata al fosfato (PBS) contenente eparina (1 000 unità/ml) e aprotinina, inibitore di proteasi (2 TIU/ml). Come ingredienti del tampone, si raccomanda di utilizzare eparina, sale ammonico e aprotinina liofilizzata. Per il prelievo ematico, si raccomanda di utilizzare una siringa (1 ml) con ago fisso sottile (Braun Omnikan-F, ad esempio). La siringa va preriempita con il tampone (circa 100 µl), per eluire completamente i piccoli volumi sanguigni da ciascun pesce. I prelievi di sangue avvengono mediante puntura cardiaca. Inizialmente, il pesce viene anestetizzato con MS-222 (100 mg/l). Un'anestesia adeguata consente di distinguere il battito cardiaco del danio zebbrato. Durante la puntura cardiaca, mantenere una pressione leggera sullo stantuffo della siringa. I volumi sanguigni che possono essere raccolti variano tra 20 e 40 microlitri. Dopo la puntura cardiaca, la miscela sangue/tampone è versata nella provetta. Il plasma è separato dal sangue mediante centrifugazione (20 minuti a 5 000 g) ed è conservato a una temperatura di -800 °C fino al momento dell'analisi.

Procedura 3C: POS: omogeneizzazione della testa e della coda nel danio zebbrato

- (1) I pesci sono anestetizzati e soppressi in modo incruento come da protocollare sperimentale.
- (2) La testa e la coda del pesce sono tagliate come indicato da figura 1.

N.B.: Tutti gli strumenti da dissezione e il tagliere vanno lavati e puliti correttamente (ad. es. con etanolo al 96 %) tra il trattamento di ciascun pesce e il successivo per evitare la "contaminazione da vitellogenina" tra le femmine o i maschi trattati e i maschi non trattati.

Figura 1



- (3) La testa e la coda di ciascun pesce sono pesate, insieme, con precisione fino al mg.
- (4) Dopo essere state pesate, tali parti sono collocate in apposite provette (ad es. provette Eppendorf da 1,5 ml) e conservate ad una temperatura di -80 °C fino alla loro omogeneizzazione oppure direttamente omogeneizzate in ghiaccio con 2 pestelli in plastica (possono essere adottati altri metodi purché implichino l'utilizzo di ghiaccio e ne risulti una massa omogenea). N.B.: Le provette vanno numerate in modo appropriato di modo che la testa e la coda del pesce possano essere collegate alla sezione corrispondente del corpo utilizzata per l'esame istologico delle gonadi.
- (5) Dopo aver ottenuto una massa omogenea, aggiungere un tampone di omogeneizzazione (*) ghiacciato del peso pari a 4 volte il peso dei tessuti. Continuare a lavorare di pestello fino a che la miscela non risulti omogenea. N.B.: Utilizzare un nuovo pestello per ciascun pesce.
- (6) I campioni sono collocati nel ghiaccio fino a centrifugazione a 50 000 g per 30 minuti e ad una temperatura di 4 °C.
- (7) Con l'uso di una pipetta ripartire porzioni di 20 µl di supernatante in almeno due provette facendo penetrare la punta della pipetta al di sotto dello strato lipidico in superficie ed aspirando con attenzione il supernatante privo di parti grasse e di precipitato.
- (8) Le provette sono conservate ad una temperatura di – 80 °C fino al loro utilizzo.

(*) **Tampone di omogeneizzazione:**

- (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % cocktail di inibitori di proteasi (Sigma)): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl cocktail di inibitori di proteasi.
 - TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) e.g. da Bie & Berntsen, Danimarca.
 - Cocktail di inibitori di proteasi: da Sigma (per i tessuti di mammiferi) n. del prodotto P 8340.
 - Nota: Il tampone di omogeneizzazione va utilizzato il giorno stesso in cui è preparato. Mantenere nel ghiaccio durante l'uso.
-

*Appendice 7***Campioni fortificati di vitellogenina e standard di riferimento inter-prova**

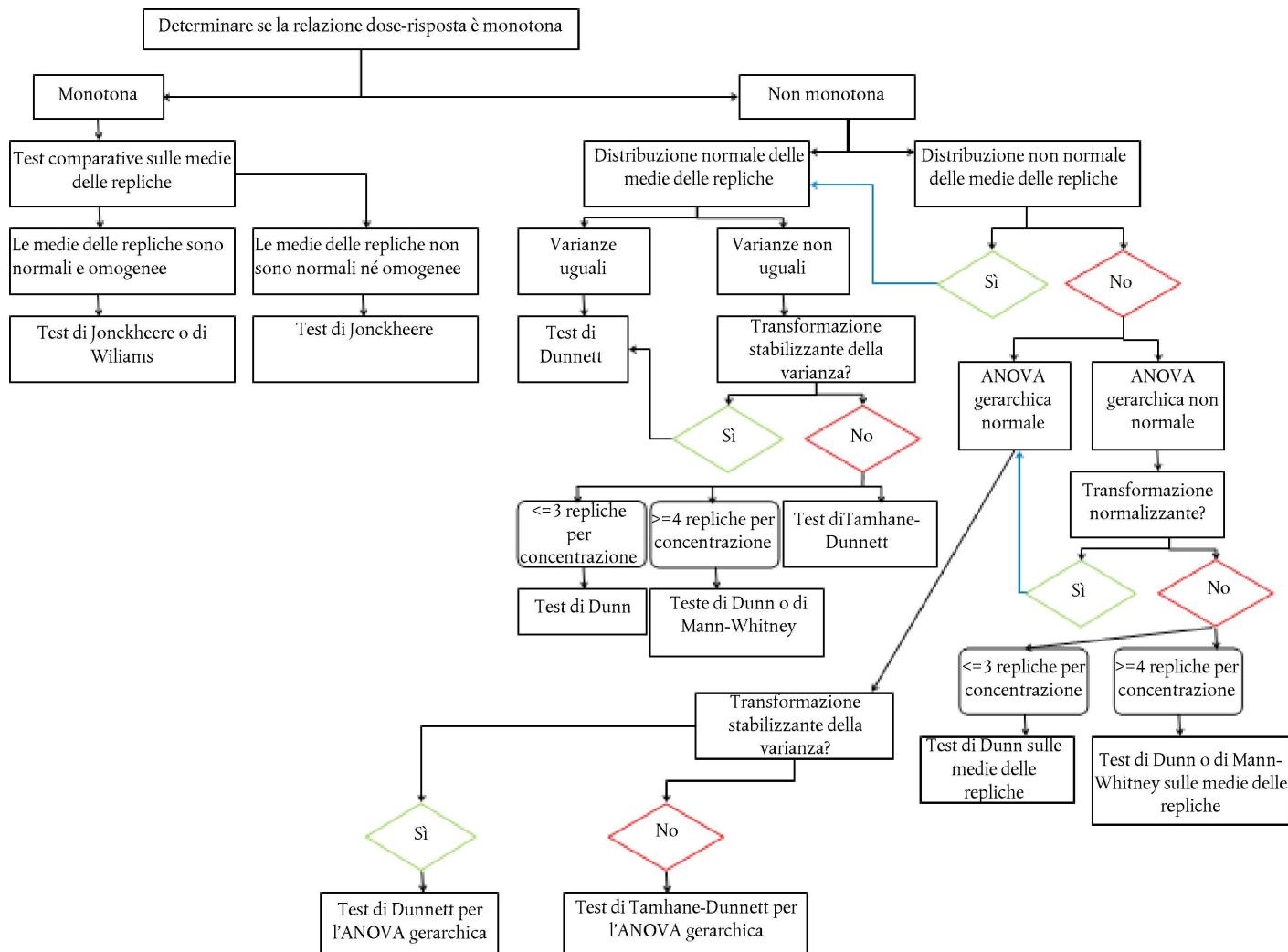
Ogni giorno in cui sono effettuate prove sulla vitellogenina, è analizzato un campione fortificato in applicazione di uno standard di riferimento inter-prova. La vitellogenina utilizzata per preparare lo standard di riferimento inter-prova proverà da un lotto diverso da quello utilizzato per preparare gli standard di calibrazione per la prova in corso.

Per preparare il campione fortificato, si aggiunge una quantità nota di standard inter-prova ad un campione di plasma di esemplare maschio di controllo. Il campione sarà ulteriormente fortificato fino a raggiungere una concentrazione di vitellogenina da 10 a 100 volte superiore alla concentrazione di vitellogenina prevista nei maschi di controllo. Il campione di plasma di esemplare maschio di controllo da fortificare può provenire da un unico esemplare o da più esemplari.

Un sottocampione del plasma di un esemplare maschio di controllo non fortificato sarà analizzato in almeno due pozzetti in duplicato. Anche il campione fortificato va analizzato in almeno due pozzetti in duplicato. Al fine di determinare la concentrazione prevista, la quantità media di vitellogenina di entrambi i campioni non rinforzati di plasma di maschio di controllo viene aggiunta alla quantità calcolata di vitellogenina aggiunta per arricchire i campioni. Il rapporto tra la concentrazione prevista e la concentrazione misurata dovrebbe essere rilevato assieme ai risultati dei singoli test effettuati lo stesso giorno.

Appendice 8

Diagramma decisionale per l'analisi statistica



C.38. PROVA SULLA METAMORFOSI DEGLI ANFIBI

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 231 (2009). La necessità di sviluppare e validare un saggio in grado di individuare le sostanze chimiche che agiscono sul sistema tiroideo dei vertebrati deriva dai timori che il livello attuale delle sostanze chimiche presenti nell'ambiente sia tale da indurre effetti nocivi sull'uomo e sulla fauna selvatica. Nel 1998 l'OCSE ha avviato un'attività ad alta priorità allo scopo di rivedere le linee guida esistenti e ad elaborarne di nuove per lo screening e la sperimentazione di potenziali interferenti endocrini. Uno degli elementi di tale attività è stato lo sviluppo di una linea guida per l'individuazione delle sostanze chimiche che agiscono sul sistema tiroideo nei vertebrati. Sono stati proposti una versione aggiornata dello "Studio della tossicità orale con somministrazione ripetuta di dosi per 28 giorni sui roditori" (capitolo B.7 del presente allegato) e una "Prova sulla metamorfosi degli anfibi". Il metodo di prova B.7 aggiornato è stato sottoposto a validazione, e successivamente pubblicato in una versione riveduta. La "Prova sulla metamorfosi degli anfibi" (*Amphibian Metamorphosis Assay — AMA*) è stata sottoposta a un programma di validazione completo, con studi intra- e inter-laboratorio, volto a dimostrarne la pertinenza e l'affidabilità (1, 2). La validazione della prova è stata poi oggetto di un esame *inter pares* da parte di una commissione formata da esperti indipendenti (3). Il presente metodo di prova è frutto dell'esperienza acquisita nel corso della validazione di studi volti all'individuazione di sostanze attive sulla tiroide, nonché dei lavori svolti altrove nei paesi membri dell'OCSE.

PRINCIPIO DELLA PROVA

2. La Prova sulla metamorfosi degli anfibi è un test di screening per individuare in modo empirico le sostanze capaci di interferire con il normale funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide (HHT). Il presente metodo di prova costituisce un modello generalizzato per i vertebrati, nella misura in cui si basa su strutture e funzioni preservate dell'asse HHT. Si tratta di una prova rilevante, poiché la metamorfosi degli anfibi è un processo studiato in modo approfondito, che dipende dalla tiroide e reagisce alle sostanze chimiche attive sull'asse HHT. Inoltre, si tratta dell'unico esperimento esistente in grado di individuare l'attività sulla tiroide in animali in fase di sviluppo morfologico.
3. Il disegno sperimentale generale comporta l'esposizione di girini allo stadio 51 della specie *Xenopus laevis* a un minimo di tre diverse concentrazioni della sostanza chimica in esame e a un campione di controllo contenente acqua di diluizione per 21 giorni. Per ciascun livello di concentrazione sperimentale sono predisposte 4 repliche. La densità delle larve all'inizio della prova è pari a 20 girini per vasca sperimentale per tutti i gruppi di trattamento. I parametri sottoposti a osservazione (*endpoint*) sono la lunghezza delle zampe posteriori, la lunghezza dall'apice del muso alla cloaca (SVL), lo stadio di sviluppo, il peso umido, l'istologia della tiroide e la mortalità giornaliera.

DESCRIZIONE DEL METODO

Specie sperimentali

4. La specie *Xenopus laevis* è comunemente coltivata in laboratorio in tutto il mondo e facilmente ottenibile in commercio. La riproduzione della specie può essere facilmente indotta durante tutto l'anno mediante iniezioni di gonadotropina corionica umana (hCG) e le larve risultanti possono essere allevate in gran numero in modo sistematico, fino allo stadio di sviluppo desiderato, per consentire l'applicazione di protocolli sperimentali su specifici stadi di sviluppo. Nell'ambito della presente prova, è preferibile utilizzare larve provenienti da adulti coltivati nel laboratorio stesso. In alternativa — benché non sia la procedura preferita — è possibile far pervenire da fuori le uova o gli embrioni al laboratorio che esegue la prova e attendere che si acclimatino. Non è invece accettabile la spedizione di animali allo stadio larvale destinati alla sperimentazione.

Attrezzature e forniture

5. Per l'esecuzione della prova sono necessari il materiale le attrezzi seguenti:
 - a) Sistema di esposizione (si veda la descrizione in appresso);
 - b) Acquari in vetro o acciaio inossidabile (si veda la descrizione in appresso);
 - c) Vasche di riproduzione;
 - d) Apparecchio di controllo della temperatura (ad es. dispositivi di riscaldamento o raffreddamento regolabili a $22^\circ \pm 1^\circ\text{C}$);

- e) Termometro;
- f) Microscopio binoculare da dissezione;
- g) Macchina fotografica digitale con risoluzione minima di 4 megapixel e funzione micro;
- h) Software di digitalizzazione delle immagini;
- i) Capsule di Petri (ad esempio 100×15 mm) o contenitori di plastica trasparente di dimensioni analoghe;
- j) Bilancia analitica, in grado di misurare 3 decimali (mg);
- k) Misuratore dell'ossigeno dissolto;
- l) pH-metro;
- m) Misuratore dell'intensità luminosa in grado di fornire risultati in lux;
- n) Vari strumenti e vetreria da laboratorio;
- o) Pipette regolabili (da 10 a 5 000 µl) o serie di pipette di dimensioni equivalenti;
- p) Sostanza chimica in esame in quantità sufficiente per condurre lo studio, preferibilmente proveniente dallo stesso lotto;
- q) Strumentazione analitica adeguata alla sostanza chimica in esame o ricorso a servizi di analisi esterni.

Idoneità della sostanza chimica ad essere testata

6. La "Prova sulla metamorfosi degli anfibi" si basa su un protocollo di esposizione in ambiente acquatico secondo il quale la sostanza chimica in esame è rilasciata nelle vasche sperimentali attraverso un sistema a flusso continuo. I metodi di flusso continuo sono tuttavia applicabili solo ad alcuni tipi di sostanze chimiche da testare, in funzione delle loro proprietà fisico-chimiche. Di conseguenza, prima di eseguire il presente protocollo, è opportuno raccogliere informazioni di base sulla sostanza chimica in questione per determinarne l'idoneità ad essere testata; consultare anche la pubblicazione dal titolo *OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures* (4). Tra le caratteristiche che indicano possibili difficoltà nel testare una sostanza chimica in ambiente acquatico figurano: elevati coefficienti di ripartizione ottanolo/acqua ($\log K_{ow}$), elevata volatilità, tendenza all'idrolisi, tendenza alla fotolisi in condizioni di illuminazione in ambiente di laboratorio. Nel valutare l'idoneità al test della sostanza in esame potrebbero essere rilevanti altri fattori, che vanno esaminati caso per caso. Se l'utilizzo di un sistema di flusso continuo non consente di ottenere validi risultati, può essere utilizzato un sistema con ricambio statico. Se nessuno dei due sistemi garantisce la validità dei risultati sperimentali, la sostanza chimica in esame non può essere testata in applicazione del presente protocollo.

Sistema di esposizione

7. Un sistema di diluizione a flusso continuo è preferibile, ove possibile, a un sistema con ricambio statico. Se le proprietà fisiche o chimiche di una delle sostanze in esame non permettono di utilizzare un sistema di diluizione a flusso continuo, si può ricorrere ad un sistema di esposizione alternativo (ad esempio sistema con ricambio statico). I componenti del sistema devono essere costituiti di materie adatto al contatto con l'acqua, come il vetro, l'acciaio inossidabile e/o il politetrafluoroetilene. Possono essere utilizzate anche materie plastiche adeguate, a condizione che non compromettano lo studio. Le vasche di esposizione devono essere di vetro o di acciaio inossidabile, dotate di un sistema di approvvigionamento dell'acqua (*standpipe*) che consenta di mantenere un volume tra 4,0 e 10,0 l e una profondità minima dell'acqua di 10-15 cm. Il sistema deve essere in grado di operare con tutte le concentrazioni di esposizione nonché un campione di controllo, con quattro repliche per livello di concentrazione. La portata del flusso verso ciascun vivaio deve essere costante (es. 25 ml/min), in modo da mantenere stabili le condizioni biologiche e l'esposizione chimica. Le vasche sperimentali vanno distribuite a caso nel sistema di esposizione, in modo da diminuire gli eventuali effetti connessi alla posizione (inclusi lievi variazioni di temperatura, dell'intensità luminosa, ecc.). Si utilizzi un'illuminazione fluorescente per generare un ciclo di 12 ore di luce e 12 ore di oscurità, con un'intensità sulla superficie dell'acqua compresa tra 600 e 2 000 lux (lumen/m²). In ciascuna vasca, le condizioni sperimentali vanno mantenute ai valori seguenti: temperatura dell'acqua a $22^\circ \pm 1$ °C, pH tra 6,5 e 8,5 e concentrazione di ossigeno dissolto (DO) superiore a 3,5 mg/l (> 40 % del valore di saturazione dell'aria). Questi valori vanno misurati almeno una volta a settimana; è auspicabile controllare la temperatura continuamente in almeno in una vasca sperimentale. L'appendice 1 precisa le condizioni sperimentali necessarie all'esecuzione del presente protocollo. Per ulteriori informazioni sull'instaurazione di sistemi di esposizione a flusso continuo e/o ricambio statico, si rimanda al documento *ASTM Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (5) e alle prove generali di tossicità acquerata.

Qualità dell'acqua

8. Può essere usata l'acqua disponibile localmente (ad esempio: acqua di sorgente o acqua di rubinetto filtrata con carbone) che permetta la crescita e lo sviluppo corretto dei girini di *X. laevis*. Poiché la qualità dell'acqua può variare in modo significativo da una zona all'altra, va condotta l'analisi della qualità dell'acqua, in particolare in mancanza di dati storici sull'uso di tale acqua per coltivare girini del genere *Xenopus*. Assicurarsi che l'acqua non contenga rame, cloro o cloramina, tutte sostanze tossiche per le rane e i girini. Si raccomanda inoltre di analizzare le concentrazioni di fluoruro, perclorato e clorato (prodotti secondari della disinfezione dell'acqua potabile) nell'ambiente acquatico, poiché tutti questi anioni sono substrati dei vettori di iodio della tiroide ed elevati tenori di qualsiasi di questi anioni sono potenzialmente in grado di falsare i risultati della prova. L'analisi va effettuata prima dell'inizio della prova, e l'acqua utilizzata a tal fine deve pertanto essere generalmente priva di tali anioni.

Concentrazione di iodio nell'acqua utilizzata per la prova

9. Ai fini della sintesi degli ormoni della tiroide è necessario che le larve dispongano di un apporto sufficiente di iodio, amministrato mediante una combinazione di acqua e regime alimentare. Attualmente non esistono raccomandazioni derivate dalla sperimentazione circa le concentrazioni di iodio minime. Tuttavia, la disponibilità di iodio può compromettere la capacità di risposta del sistema tiroideo nei confronti delle sostanze attive sulla tiroide; è risaputo inoltre che essa influenza l'attività basale della ghiandola, è necessario pertanto prendere in considerazione questo aspetto nell'interpretazione dei risultati dell'istopatologia della tiroide. Per questo motivo vanno registrate le concentrazioni di iodio misurate nell'ambiente idrico utilizzato per la prova. Dati provenienti da studi di validazione dimostrano che il presente protocollo funziona correttamente quando le concentrazioni di ioduro (I^-) nell'acqua di prova sono comprese nell'intervallo tra 0,5 e 10 $\mu\text{g/l}$. Idealmente, tale concentrazione non deve scendere al di sotto di 0,5 $\mu\text{g/l}$. Quando la prova è eseguita con acqua deionizzata, si deve aggiungere un supplemento di iodio per raggiungere la concentrazione minima di 0,5 $\mu\text{g/l}$. Qualsiasi aggiunta di iodio o altri sali nell'acqua di prova va indicata nella relazione.

Manutenzione degli animali

Cura e riproduzione degli adulti

10. La cura e la riproduzione degli adulti vanno eseguite conformemente alle linee guida standard. Per maggiori informazioni, il lettore consulta gli orientamenti sulle prove di teratogenesi su embrioni di rana (FETAX) (6). Le linee guida standard riportano un esempio dei metodi adeguati di cura e riproduzione, ma non è necessario conformarvisi alla lettera. Per favorire la riproduzione, le coppie (3-5) di maschi e femmine adulti ricevono un'iniezione di gonadotropine corionica umana (HCG). La dose somministrata ai maschi e alle femmine è rispettivamente di circa 800 UI-1 000 UI e 600 UI-800 UI di HCG sciolta in una soluzione salina allo 0,6-0,9 %. Per stimolare la copulazione, le coppie riproduttrici sono mantenute in grandi vasche, al riparo da perturbazioni e in condizioni statiche. Ciascuna vasca di riproduzione è dotata di un finto doppiopondo formato da una griglia di plastica o acciaio inossidabile che consente alle uova di cadere sul fondo. Le rane che ricevono un'iniezione nel tardo pomeriggio depositano generalmente la maggior parte delle loro uova verso metà mattina del giorno successivo. Dopo la deposizione e la fecondazione di una quantità sufficiente di uova, gli adulti sono rimossi dalle vasche di riproduzione.

Cura e selezione delle larve

11. Dopo aver rimosso gli adulti dalle vasche di riproduzione, si procede a raccogliere le uova e ad esaminarne la vitalità sulla base di un sottocampione di embrioni rappresentativi provenienti da tutte le vasche. La o le singole deposizioni di uova che hanno dato i risultati migliori (si raccomanda di esaminarne 2 o 3 per valutarne la qualità) sono scelte sulla base del criterio della vitalità e della presenza di un'adeguata quantità di embrioni (min. 1 500). Tutti gli organismi utilizzati nello studio devono provenire da un medesimo evento riproduttivo (non vanno mescolate più deposizioni di uova). Gli embrioni sono trasferiti in una scatola o in un recipiente piatto e tutte le uova manifestamente morte o anomale [cfr. definizione in (5)] sono rimosse con una pipetta. Gli embrioni sani di ciascuno dei tre eventi riproduttivi sono trasferiti in tre diverse vasche di schiusa. Quattro giorni dopo tale trasferimento è selezionata la migliore riproduzione in base a criteri di vitalità e di successo della schiusa e le larve sono ripartite tra un numero adeguato di vasche di coltura a $22^\circ \pm 1^\circ\text{C}$. Inoltre, altre larve sono trasferite in vasche supplementari, da usare come sostituzione nell'ipotesi in cui si osservi mortalità nelle vasche di coltura durante la prima settimana. Questa procedura permette di mantenere un'analogia densità di individui, riducendo quindi le disparità di sviluppo all'interno della coorte di uno stesso evento riproduttivo. Tutte le vasche di allevamento vanno pulite giornalmente mediante sifone. Per precauzione, è preferibile usare guanti in vinile o nitrile anziché guanti in lattice. Gli esemplari morti sono rimossi tutti i giorni e vanno inserite larve sostitutive per mantenere costante la densità di organismi durante la prima settimana. Le larve sono alimentate almeno due volte al giorno.

12. Durante la fase di pre-esposizione i girini sono acclimatati alle condizioni in cui avverrà l'esposizione reale, compreso il tipo di mangime, la temperatura, il ciclo luce/buio e il mezzo di coltura. Si raccomanda pertanto di utilizzare la stessa acqua di diluizione/coltura durante la fase di pre-esposizione e di esposizione. Se si utilizza un sistema di coltura statico per mantenere i girini durante la fase di pre-esposizione, il mezzo di coltura deve essere rinnovato completamente almeno due volte alla settimana. È opportuno evitare il sovrappopolamento dovuto a un'elevata densità di larve durante il periodo di pre-esposizione, in quanto tali condizioni possono perturbare sensibilmente lo sviluppo dei girini durante la successiva fase di prova. Pertanto la densità culturale non deve superare circa 4 girini per litro di mezzo di coltura (nel caso di un sistema di esposizione statico) o di 10 girini per litro di mezzo di coltura (considerando ad esempio una portata di 50 ml/minuto del sistema di pre-esposizione o culturale). In tali condizioni, i girini dovrebbero passare dallo stadio 45/46 allo stadio 51 entro dodici giorni. Lo stadio di sviluppo dei girini rappresentativi di questa popolazione è valutato ogni giorno al fine di stabilire quale sia il momento più adatto per iniziare l'esposizione. Si deve prestare la massima attenzione a ridurre al minimo lo stress e i traumi per i girini, soprattutto durante i trasferimenti, la pulizia delle vasche e la manipolazione delle larve. Analogamente, va evitata qualsiasi attività o condizione stressante, in particolare rumori forti e/o continui, picchiettamenti sulle vasche o vibrazioni nelle vasche, eccessiva attività di laboratorio e repentini cambiamenti ambientali (esposizione alla luce, temperatura, pH, OD, portata del flusso, ecc.). Se i girini non raggiungono lo stadio 51 entro 17 giorni dalla fecondazione, una delle potenziali cause va rinvenuta nell'eccesso di stress.

Coltura e alimentazione delle larve

13. I girini sono nutriti con, ad esempio, idonei mangimi commerciali utilizzati negli studi di validazione (cfr. anche l'appendice 1) durante il periodo di pre-esposizione [dopo lo stadio 45/46 secondo Nieuwkoop e Faber (NF) (8)] e durante l'intero periodo di prova di 21 giorni; in alternativa può essere adottato qualsiasi altro regime alimentare che abbia dato prova delle stesse prestazioni nell'ambito di una prova sulla metamorfosi degli anfibi. Durante il periodo di eventuale pre-esposizione, il regime alimentare deve essere accuratamente adattato per soddisfare le esigenze di girini in via di sviluppo. In pratica, sono somministrate piccole porzioni di cibo più volte al giorno (almeno due volte) alle larve appena schiuse. Tuttavia, l'eccesso di cibo è da evitare per i) mantenere la qualità dell'acqua e ii) prevenire le incrostazioni dei filtri delle branchie con particelle alimentari e rifiuti. Nel caso di utilizzo dei mangimi utilizzati negli studi di validazione, le razioni giornaliere sono aumentate parallelamente alla crescita dei girini fino a raggiungere circa 30 mg/animale/giorno prima dell'inizio della prova. Come è stato dimostrato dagli studi di validazione, questo mangime per girini disponibile in commercio si è dimostrato adatto a consentire una crescita e uno sviluppo adeguati delle larve di *X. laevis*. Costituito da particelle fini, rimane in sospensione nella colonna d'acqua per un lungo periodo e è evacuato dal sistema mediante il flusso. La razione giornaliera totale di cibo deve essere ripartita in piccole porzioni, distribuite almeno due volte al giorno (il regime alimentare è descritto nella tabella 1). Vanno registrate la quantità di cibo somministrata e la frequenza. Il mangime può essere somministrato secco o in forma di soluzione madre in acqua di diluizione, che va preparata fresca ogni due giorni e conservata a 4 °C quando non utilizzata.

Tabella 1

Regime alimentare per i girini *X. laevis* con mangimi commerciali per girini utilizzati negli studi di validazione durante la fase della prova in cui gli animali sono in vita, in condizioni di flusso continuo

Giorno di studio	Razione alimentare (mg di cibo/animale/ giorno)
0-4	30
5-7	40
8-10	50
11-14	70
15-21	80

Analisi chimica

14. Prima di iniziare lo studio, occorre valutare la stabilità della sostanza chimica in esame sulla base delle informazioni disponibili relative a solubilità, degradabilità e volatilità. Sono prelevati campioni delle soluzioni di prova da ciascuna replica per ciascuna concentrazione, che sono sottoposti ad analisi chimiche all'inizio della prova (giorno 0), e una volta alla settimana durante la prova per un minimo di quattro campioni. Si raccomanda inoltre di analizzare ciascuna concentrazione di prova durante la preparazione del sistema al fine di verificarne l'efficacia, prima di avviare la prova. Anche l'analisi delle soluzioni madre è consigliata ogni volta che vi siano delle modifiche, soprattutto se il volume delle soluzioni madre non fornisce una quantità di sostanza chimica sufficiente a coprire l'intero periodo dei campionamenti di routine. Nel caso di sostanze chimiche non rilevabili ad alcune o a tutte le concentrazioni utilizzate nella prova, è necessario misurare le soluzioni madre e registrare la portata del flusso del sistema al fine di calcolare le concentrazioni nominali.

Somministrazione della sostanza chimica

15. Il metodo utilizzato per introdurre nel sistema la sostanza chimica in esame è variabile in funzione delle sue caratteristiche fisico-chimiche. Le sostanze chimiche solubili in acqua possono essere disciolte in aliquote dell'acqua utilizzata per la prova ad una concentrazione che consenta di ottenere che la concentrazione sperimentale voluta sia rilasciata mediante un sistema di flusso continuo. Le sostanze chimiche liquide a temperatura ambiente, ma scarsamente solubili in acqua possono essere introdotte con metodi di saturazione liquido-liquido. Le sostanze chimiche solide a temperatura ambiente e scarsamente solubili in acqua possono essere introdotte nel sistema mediante colonne di saturazione con lana di vetro (7). Vanno privilegiati i sistemi sperimentali che non fanno uso di vettori; tuttavia sostanze chimiche in esame diverse presentano proprietà fisico-chimiche diverse che richiedono approcci diversi di preparazione delle soluzioni acquose per l'esposizione chimica. Si deve tuttavia cercare, in via prioritaria, di evitare solventi e altri vettori, in quanto: i) alcuni solventi stessi possono rivelarsi tossici e/o indurre risposte endocrine indesiderate o inattese, ii) testare le sostanze chimiche ad una concentrazione superiore alla loro solubilità in acqua (il che avviene spesso se si usano solventi) può falsare la determinazione delle concentrazioni efficaci, e iii) il ricorso a solventi nelle prove a lungo termine può portare alla formazione significativa di biofilm associati all'attività microbica. Nel caso di sostanze chimiche difficili da testare, il solvente può essere utilizzato soltanto come ultima istanza e si deve consultare il documento *OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures* (4) per stabilire la migliore metodologia da seguire. Il solvente è scelto in base alle proprietà chimiche della sostanza chimica in esame. Tra i solventi che si sono rivelati efficaci per le prove di tossicità acuatica figurano acetone, etanolo, metanolo, dimetilformammide e glicole trietilenico. Se si utilizza un solvente come vettore, le concentrazioni devono rimanere inferiori alla concentrazione cronica senza effetti osservati (NOEC); il documento di orientamento dell'OCSE raccomanda un massimo di 100 µl/l, tuttavia una recente relazione limita la concentrazione raccomandata di solvente a 20 solo µl/l di acqua di diluizione (12). Inoltre, se si utilizza un solvente come vettore, occorre valutare idonei controlli con solvente in aggiunta ai controlli senza solvente (acqua pulita). Se non è possibile introdurre la sostanza chimica mediante acqua, a causa delle sue caratteristiche fisico-chimiche (bassa solubilità) o della sua disponibilità limitata, se ne può considerare la somministrazione tramite alimentazione. Sono stati svolti lavori preliminari sull'esposizione mediante alimentazione, tuttavia tale metodologia resta marginale. La scelta del metodo va documentato e verificato in modo analitico.

Scelta delle concentrazioni sperimentali

Determinazione della concentrazione più alta

16. Ai fini della prova la concentrazione più alta corrisponde alla concentrazione minore tra: il limite di solubilità della sostanza chimica in esame; la concentrazione massima tollerata (CMT) per sostanze chimiche altamente tossiche; o una concentrazione pari a 100 mg/l.
17. La CMT è definita come la concentrazione della sostanza chimica in esame più elevata che comporta meno del 10 % di mortalità acuta. Per avvalersi di tale approccio, è necessario disporre dei dati empirici relativi alla mortalità acuta in modo da stimare il valore della CMT. La stima della CMT può risultare inesatta e generalmente richiede il parere professionale di un esperto. Benché i modelli di regressione costituiscano il metodo tecnicamente più valido per stimare la CMT, è possibile ottenere un'approssimazione utile mediante i dati esistenti sulla CMT utilizzando il valore corrispondente a 1/3 della LC₅₀. Tuttavia, potrebbero non essere disponibili dati sulla tossicità acuta per le specie utilizzate nella prova. In tal caso, può essere effettuato un test di LC₅₀ per 96 ore su girini rappresentativi (cioè dello stesso stadio di sviluppo) della popolazione soggetta al presente metodo di prova. È altresì possibile, se sono disponibili dati per altre specie acuatiche (ad esempio studi di LC₅₀ nei pesci o in altri anfibi), ricorrere al parere di un esperto che fornirà una stima probabile della CMT basata su estrapolazioni interspecie.

18. In alternativa, se la sostanza chimica non presenta una tossicità acuta e rimane solubile a più di 100 mg/l, la soglia di 100 mg/l deve essere considerata la "concentrazione massima di prova", giacché essa è generalmente considerata "praticamente non tossica".
19. Benché non si tratti della procedura raccomandata: possono essere utilizzati metodi con ricambio statico se i metodi a flusso continuo si rivelano inadeguati a conseguire la CMT. Se vengono utilizzati metodi con ricambio statico, la concentrazione della sostanza chimica in esame va documentata e deve rimanere nei limiti dei criteri previsti per la prova. Si raccomandano periodi di ricambio di 24 ore, mentre non sono accettabili periodi di ricambio che superano le 72 ore. Inoltre, i parametri relativi alla qualità dell'acqua (compresi OD, temperatura, pH, ecc.) vanno misurati alla fine di ciascun periodo di ricambio, subito prima di procedere al nuovo ricambio.

Intervallo delle concentrazioni di prova

20. Il minimo richiesto comprende tre concentrazioni di prova e un controllo con acqua pulita (più un campione di controllo del mezzo disperdente, se del caso). La differenza tra la concentrazione sperimentale più alta e quella più bassa dovrebbe essere pari a un ordine di grandezza. Il fattore di distanza fra due dosi consecutive deve essere compreso tra 0,1 (separazione massima) e 0,33 (separazione minima).

PROCEDURA

Avvio e svolgimento della prova

Giorno 0

21. L'esposizione ha inizio quando un numero sufficiente di girini della popolazione in fase di pre-esposizione ha raggiunto lo stadio di sviluppo 51 [secondo Nieuwkoop e Faber (8)], ma ha un'età inferiore o pari a 17 giorni dalla fecondazione. Per selezionare gli esemplari destinati alla prova, si raggruppano i girini di aspetto normale e sano in un'unica vasca contenente un volume adeguato di acqua di diluizione. Per determinarne lo stadio di sviluppo, i girini sono rimossi individualmente dalla vasca comune mediante un retino o un filtro e trasferiti in una camera di misurazione trasparente (ad esempio una capsula di Petri da 100 mm) riempita con acqua di diluizione. A tal fine è preferibile non ricorrere all'anestesia, ma se si opta per tale operazione ciò va fatto sui singoli girini usando 100 mg/l di metansolfonato di tricaina (ad. es. MS-222), opportunamente tamponato con bicarbonato di sodio (pH 7,0), prima della manipolazione. Se si ricorre all'anestesia, occorre ottenere da un laboratorio esperto informazioni sulla metodologia adeguata per fare un uso corretto, ad esempio, dell'MS-222 a fini anestetici; la metodologia va registrata nella relazione assieme ai risultati della prova. Gli animali vanno manipolati con cura durante il trasferimento per ridurre al minimo lo stress ed evitare qualsiasi lesione.
22. Lo stadio di sviluppo degli individui è stabilito utilizzando un microscopio binoculare da dissezione. Per ridurre la variabilità finale dello stadio di sviluppo, è importante effettuare tale esame nel modo più preciso possibile. Secondo Nieuwkoop e Faber (8), il riferimento di sviluppo primario per la selezione delle larve che hanno raggiunto lo stadio 51 è costituito dalla morfologia delle zampe posteriori. Pertanto vanno esaminate al microscopio le caratteristiche morfologiche delle zampe posteriori. Il manuale completo di Nieuwkoop e Faber (8) va consultato per raccogliere informazioni complete sulla determinazione dello stadio di sviluppo dei girini; tuttavia, è anche possibile individuare tale stadio in modo attendibile mediante criteri morfologici apparenti. La seguente tabella può aiutare a semplificare e razionalizzare il processo di determinazione dello stadio di sviluppo durante tutto lo studio, individuando i criteri morfologici apparenti associati ai vari stadi, nell'ipotesi di uno sviluppo normale.

Tabella 2

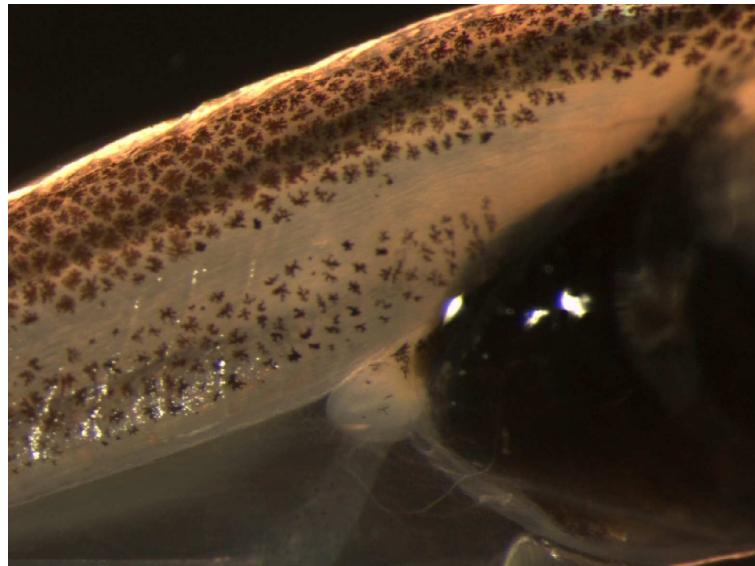
Criteri morfologici apparenti per la determinazione dello stadio di sviluppo secondo le raccomandazioni di Nieuwkoop e Faber

Criteri morfologici apparenti	Stadio di sviluppo															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Zampe posteriori	X	X	X	X	X	X	X									
Zampe anteriori						X	X	X	X							
Struttura craniofacciale										X	X	X	X			
Morfologia del nervo olfattivo											X	X	X			
Lunghezza della coda													X	X	X	X

23. Per avviare la prova, tutti i girini devono trovarsi allo stadio 51. Il principale criterio morfologico apparente per la determinazione dello stadio di sviluppo è la morfologia delle zampe posteriori, come indicato nella figura 1.

Figura 1

Morfologia delle zampe posteriori di un girino di *X. laevis* nello stadio 51.



24. Oltre alla selezione in funzione dello stadio di sviluppo, è anche possibile selezionare gli animali destinati alla sperimentazione in funzione delle loro dimensioni. A tal fine, registrare la lunghezza totale del corpo (diversa dalla lunghezza dall'apice del muso alla cloaca — SVL) il giorno 0 presso un sottocampione di circa 20 girini allo stadio 51, secondo Nieuwkoop e Faber. Una volta calcolata la media della lunghezza totale del corpo per questo gruppo di individui, i limiti minimi e massimi di tale lunghezza per gli animali sperimentali sono fissati a ± 3 mm rispetto al valore medio (i valori medi della lunghezza totale del corpo sono compresi tra 24,0 e 28,1 mm per i girini dello stadio 51). La determinazione dello stadio di sviluppo rimane tuttavia il principale parametro per valutare se un animale è pronto per la prova. I girini che presentano evidenti malformazioni o lesioni vanno esclusi dalla prova.
25. I girini che soddisfano i menzionati criteri relativi allo stadio di sviluppo sono trasferiti in una vasca con acqua di coltura pulita fino al completamento del processo di determinazione dello stadio di sviluppo. Una volta terminata questa fase, le larve sono ripartite a caso nelle vasche destinate al trattamento di esposizione, fino a che ognuna ne contenga 20. Ciascuna vasca è ispezionata al fine di individuare esemplari di apparenza anormale (ad. es., lesioni, movimenti natatori anomali, ecc.). I girini di aspetto manifestamente insano sono rimossi dalle vasche di trattamento e sostituiti con larve appena selezionate dalla vasca comune.

Osservazioni

26. Informazioni più approfondite sulle procedure di completamento della prova e sul trattamento dei girini sono disponibili nel documento dell'OCSE intitolato *Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology* (9).

Misurazioni al giorno 7

27. Il giorno 7 si prelevano a caso 5 girini da ciascuna vasca sperimentale. La procedura *random* utilizzata deve garantire a tutti i girini la medesima probabilità di essere selezionati. Ciò può essere ottenuto in applicazione di qualsiasi metodo di scelta casuale ma esige che ciascun girino sia catturato con un retino. I girini non selezionati sono reinseriti nella vasca di origine; gli esemplari selezionati sono soppressi in modo incruento in 150-200 mg/l di, ad esempio, MS-222 adeguatamente tamponato con bicarbonato di sodio per raggiungere pH 7,0. I girini soppressi sono risciacquati, asciugati con carta assorbente e pesati al milligrammo. Per ciascun girino, vanno misurate la lunghezza delle zampe posteriori, la lunghezza dall'apice del muso alla cloaca e lo stadio di sviluppo (verificato utilizzando un microscopio binoculare da dissezione).

Misurazioni al giorno 21 (completamento della prova)

28. Alla conclusione della prova (giorno 21), i girini restanti sono soppressi in modo incruento in 150-200 mg/l di, ad esempio, MS-222 adeguatamente tamponato con bicarbonato di sodio, come sopra descritto. I girini sono risciacquati, asciugati con carta assorbente e pesati al milligrammo. Per ciascun girino, vanno misurati la lunghezza delle zampe posteriori, la lunghezza dall'apice del muso alla cloaca e lo stadio di sviluppo.
29. Ai fini degli esami istologici, tutte le larve sono quindi inserite nel fissativo di Davidson per 48-72 ore sotto forma di campioni di corpo intero o di campioni di tessuti della testa, compresa la mandibola. Per l'esame istopatologico si preleva da ciascuna replica un campione di cinque girini. Dato che l'altezza delle cellule follicolari della tiroide dipende dallo stadio di sviluppo (10), l'approccio più adatto per il campionamento ai fini dell'analisi istologica consiste nel selezionare esemplari che hanno raggiunto lo stesso stadio, ove possibile. A tal fine, è necessario conoscere lo stadio di tutte le larve prima della selezione e del successivo trattamento ai fini della raccolta e della conservazione dei dati. Ciò è necessario perché normali differenze nello sviluppo si traducono in differenze nella distribuzione dei vari stadi di sviluppo all'interno di ciascuna vasca di replica.
30. Gli animali selezionati per l'esame istopatologico ($n = 5$ per ogni replica) devono corrispondere allo stadio mediano registrato nei controlli (repliche raggruppate), per quanto possibile. Se esistono repliche che contengono più di 5 larve dello stadio appropriato, selezionarne a caso cinque.
31. Al contrario, se vi sono repliche con meno di cinque animali dello stadio adeguato, selezionare in modo casuale tra la popolazione dello stadio immediatamente inferiore o superiore fino a raggiungere il numero di cinque larve per replica. Idealmente, la scelta di campionare ulteriori larve dalla popolazione che si trova nello stadio di sviluppo immediatamente inferiore o superiore va fatta in base a una valutazione complessiva della distribuzione degli stadi di sviluppo nelle popolazioni di controllo e in quelle sottoposte a trattamento chimico. Pertanto, se l'esposizione chimica comporta un ritardo di sviluppo, occorrerà prelevare altre larve dalla popolazione di stadio immediatamente inferiore. Viceversa, se l'esposizione chimica comporta un'accelerazione dello sviluppo, vanno prelevate le larve supplementari dallo stadio di sviluppo immediatamente superiore.
32. In caso di gravi alterazioni nello sviluppo dei girini a causa del trattamento con la sostanza chimica in esame, è possibile che la distribuzione degli stadi osservati nella popolazione esposta al trattamento chimico non si sovrapponga alla mediana degli stadi di sviluppo calcolata per i controlli. Solo in questi casi, il processo di selezione deve essere modificato utilizzando uno stadio di sviluppo diverso dalla mediana degli stadi di sviluppo osservati per i controlli, al fine di ottenere un campione di larve per l'esame istologico della tiroide al medesimo stadio di sviluppo. Inoltre, se gli stadi sono indeterminati (in caso di asincronia), sono scelti a caso 5 girini in ciascuna replica per gli esami istologici. Vanno annotate le ragioni che hanno portato al campionamento casuale di larve che presentano uno stadio di sviluppo diverso dalla mediana degli stadi di sviluppo raggiunti dai girini nei gruppi di controllo.

Determinazione dei parametri biologici in osservazione

33. Durante il periodo di esposizione di 21 giorni, sono effettuate misurazioni dei parametri primari in osservazione (*endpoint primari*) nei giorni 7 e 21; tuttavia si rende necessaria un'osservazione quotidiana della popolazione in esame. La tabella 3 presenta un riepilogo dei parametri da misurare e il rispettivo momento dell'osservazione. Informazioni più dettagliate in merito alle tecniche di misurazione degli *endpoint apicali* e delle valutazioni istologiche sono disponibili nel documento d'orientamento dell'OCSE (9).

Tabella 3

Momento dell'osservazione dei parametri primari nella prova

Parametri apicali	Giornalmente	Giorno 7	Giorno 21
— - Mortalità	•		
— - Stadio di sviluppo		•	•
— - Lunghezza delle zampe posteriori		•	•
— - Lunghezza dall'apice del muso alla cloaca (LMC)		•	•
— - Peso umido del corpo		•	•
— - Istologia della tiroide			•

Parametri apicali

34. Lo stadio di sviluppo, la lunghezza delle zampe posteriori, la SVL ed il peso umido costituiscono i parametri (*endpoint*) apicali della Prova sulla metamorfosi degli anfibi; ognuno di essi è brevemente discusso di seguito. Maggiori informazioni tecniche sulla raccolta di tali dati sono disponibili nel documento di orientamento dell'OCSE citato in riferimento, che include, tra l'altro, le procedure di analisi computerizzata raccomandate.

Stadio di sviluppo

35. Lo stadio di sviluppo dei girini di *X. laevis* è determinato sulla base dei criteri di valutazione stabiliti da Nieuwkoop e Faber (8). I dati relativi allo stadio di sviluppo permettono di individuare se esso è accelerato, asincrono, ritardato o non è influenzato. Un'accelerazione o un ritardo di sviluppo vengono individuati confrontando lo stadio mediano ottenuto nei gruppi di controllo e nei gruppi trattati, rispettivamente. Si registra uno sviluppo asincrono quando i tessuti osservati non presentano alcuna anomalia o malformazione, ma i tempi della morfogenesi o dello sviluppo dei vari tessuti sono sfasati nello stesso individuo.

Lunghezza delle zampe posteriori

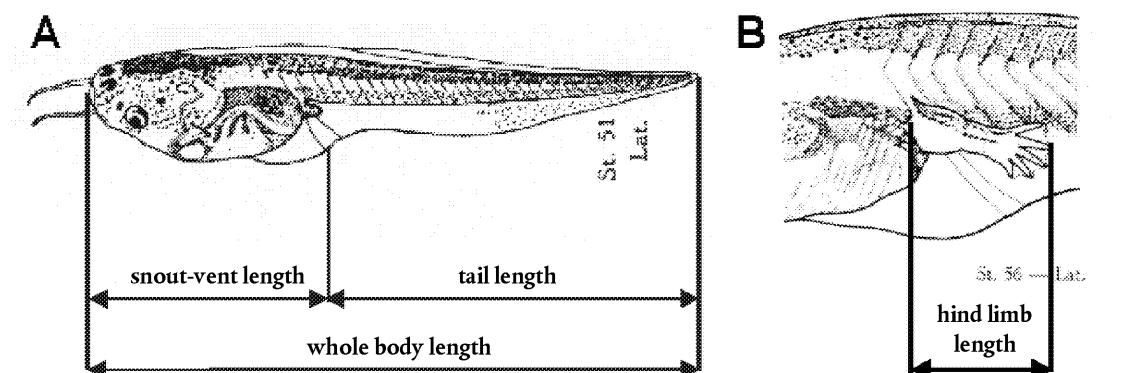
36. La differenziazione e la crescita delle zampe posteriori sono controllate dagli ormoni tiroidei e costituiscono criteri di sviluppo fondamentali, già utilizzati ai fini della determinazione dello stadio di sviluppo. Lo sviluppo delle zampe posteriori è assunto come dato qualitativo per determinare lo stadio di sviluppo, ma, nel presente caso, è considerato un parametro quantitativo. Di conseguenza, la lunghezza delle zampe posteriori è misurata come parametro volto a individuare effetti sull'asse tiroideo (Figura 2). Per motivi di coerenza, la lunghezza è misurata sulla zampa posteriore sinistra. La lunghezza delle zampe posteriori è rilevata nei giorni 7 e 21 dello studio. Il giorno 7, la misurazione di questo valore non pone difficoltà, come illustra il grafico 2, mentre il giorno 21 tale misurazione è resa più complicata dalle curve della zampa. Pertanto la misurazione del giorno 21 fa effettuata partendo dalla parete corporale e seguendo la linea mediana della zampa attraverso tutte le deviazioni angolari. Le variazioni di lunghezza delle zampe posteriori osservate il giorno 7, anche se non evidenti al giorno 21, sono comunque considerate indicazioni di una potenziale attività sulla tiroide. Le lunghezze sono misurate su fotografie digitali, applicando un software per l'analisi delle immagini, come descritto nel documento di orientamento dell'OCSE intitolato *Guidance Document on Amphibian Thyroid Histopathology* (9).

Lunghezza del corpo e peso umido

37. Le misurazioni della lunghezza dall'apice del muso alla cloaca (SVL) (Figura 2) e del peso umido sono riportate nella relazione sulla prova al fine di valutare i possibili effetti delle sostanze chimiche in esame sul tasso di crescita dei girini mediante confronto con un gruppo di controllo. Inoltre, questi valori sono utili per rilevare la tossicità generale della sostanza chimica in esame. Dato che l'eliminazione del velo d'acqua prima della pesata può causare stress e lesioni cutanee ai girini, tali registrazioni sono eseguite su un sottocampione il giorno 7, prima di essere effettuate su tutti gli animali al completamento della prova (giorno 21). A fini di coerenza, si deve utilizzare la parte anteriore della cloaca come limite posteriore della misurazione.
38. La lunghezza dall'apice del muso alla cloaca (SVL) serve a valutare la crescita dei girini, come illustrato nella figura 2.

Figura 2

(A) Tipi di misurazioni della lunghezza del corpo e (B) della lunghezza delle zampe posteriori nei girini della specie *X. laevis* (1).



Istologia della tiroide

39. Le osservazioni dello stadio di sviluppo e della lunghezza delle zampe posteriori sono importanti per valutare le modifiche dello sviluppo metamorfico dovute all'esposizione; tuttavia, un ritardo di sviluppo non può essere, di per sé, considerato indicativo di un'attività antitiroidea. Alcune modifiche sono osservabili solo nel corso degli esami istopatologici di routine. I criteri diagnostici comprendono l'ipertrofia/atrofia della tiroide, l'ipertrofia delle cellule follicolari, l'iperplasia delle cellule follicolari e, come criteri qualitativi complementari: la superficie del lume del follicolo, la qualità del colloide e le dimensioni/forma delle cellule follicolari. Va indicato nella relazione il grado di intensità (4 gradi). Ulteriori informazioni sulla raccolta e il trattamento dei campioni per l'esame istologico, e sull'esecuzione di tali analisi sui campioni tissutali sono disponibili nei documenti intitolati *Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 — Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation* e *Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 — Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas* (9). I laboratori che svolgono la presente prova per la prima volta sono invitati a chiedere la consulenza di esperti patologi ai fini di formazione, prima di procedere all'esame istologico e alla valutazione della tiroide. Le alterazioni significative e manifeste osservate nei parametri apicali che indicano un'accelerazione o un'asincronia dello sviluppo possono dispensare dall'eseguire esami istopatologici sulla tiroide. Tuttavia, l'assenza di alterazioni morfologiche evidenti o l'evidenza di ritardo dello sviluppo giustificano il ricorso agli esami istologici.

Mortalità

40. Tutte le vasche sperimentali sono controllate quotidianamente per individuare girini morti e registrarne il numero per ciascuna vasca. Per ogni caso di mortalità vanno registrati la data, la concentrazione e il numero della vasca. Gli animali morti sono rimossi dalla vasca non appena individuati. I tassi di mortalità superiore al 10 % potrebbero indicare condizioni sperimentali inadeguate o effetti tossici della sostanza chimica in esame.

Osservazioni complementari

41. I casi di comportamento anomalo, malformazioni e lesioni molto evidenti vanno registrati. Per ognuno di tali casi, vanno registrati la data, la concentrazione e il numero della rispettiva vasca. Si riscontra un comportamento normale quando i girini rimangono sospesi nella colonna d'acqua, con la coda più alta della testa, battono la pinna caudale in modo ritmico e regolare, risalgono periodicamente in superficie, muovono gli opercoli e reagiscono agli stimoli. Viceversa, un comportamento anomalo implica, ad esempio, che gli animali galleggiano in superficie, rimangono immobili sul fondo della vasca, nuotano in modo inverso o irregolare, non risalgono in superficie, e non reagiscono agli stimoli. Inoltre, vanno registrate anche grandi differenze nel consumo di cibo tra i gruppi di trattamento. Le malformazioni e le lesioni apparenti possono manifestarsi tra l'altro con anomalie morfologiche (ad esempio deformità dei membri), lesioni emorragiche, infezioni batteriche o micotiche. Tali determinazioni sono di natura qualitativa e sono considerate analoghe ai sintomi clinici di malattie o stress e sono il risultato di confronti con gli animali di controllo. Se tali anomalie o le loro occorrenze risultano superiori nelle vasche esposte rispetto al gruppo di controllo, ciò costituisce la prova di una tossicità evidente.

DATI E RELAZIONE

Raccolta di dati

42. Tutti i dati sono raccolti utilizzando sistemi elettronici o manuali conformi alle buone pratiche di laboratorio (BPL). I dati devono comprendere:

Sostanza chimica in esame:

- caratterizzazione della sostanza chimica in esame, proprietà fisico-chimiche, informazioni sulla stabilità e la biodegradabilità;
- informazioni e dati chimici: metodo e frequenza di preparazione delle diluizioni. Le informazioni sulle sostanze chimiche in esame devono specificare le concentrazioni reali e nominali e, in alcuni casi, quelle della sostanza chimica non progenitrice, come opportuno. Le misurazioni sulla sostanza chimica in esame possono quindi essere necessarie sia per le soluzioni madre che per le soluzioni di prova;
- solvente (se diverso dall'acqua): giustificazione della scelta e caratterizzazione del solvente (tipo, concentrazione usata).

Condizioni sperimentali:

- registri operativi: contengono le osservazioni relative al funzionamento del sistema sperimentale nonché all'ambiente e alle infrastrutture relative. Solitamente, i registri comprendono: la temperatura ambiente e la temperatura di prova, il periodo di esposizione luminosa, lo stato dei componenti fondamentali del sistema di esposizione (compresa le pompe, i contatori di cicli, pressioni), la portata dei flussi, i livelli idrometrici, i rinnovi delle bottiglie con la soluzione madre, e le relazioni sul regime alimentare. I parametri generali sulla qualità dell'acqua comprendono: pH, ossigeno dissolto, conducibilità, iodio totale, alcalinità e durezza;
- deviazioni rispetto al metodo di prova: tutte le informazioni o le descrizioni esplicative delle deviazioni rispetto al metodo di prova.

Risultati:

- osservazioni e dati biologici: le osservazioni giornaliere sulla mortalità, il consumo di cibo, i comportamenti natatori anomali, la letargia, la perdita di equilibrio, le malformazioni, le lesioni, ecc. Le osservazioni e i dati raccolti a intervalli prestabiliti includono: lo stadio di sviluppo, la lunghezza delle zampe posteriori, la lunghezza dall'apice del muso alla cloaca e il peso umido;
- tecniche di analisi statistica utilizzate e motivazione del loro uso; i risultati dell'analisi statistica vanno preferibilmente presentati sotto forma di tabella;
- dati istologici: le descrizioni esplicative, nonché il grado di intensità e il tasso d'incidenza delle osservazioni specifiche, come descritto nel documento di orientamento sull'istopatologia;
- osservazioni ad hoc: le descrizioni esplicative relative allo studio che non rientrano nelle categorie descritte in precedenza.

Presentazione dei dati

43. L'appendice 2 riporta dei fogli di calcolo per la registrazione quotidiana dei dati che possono facilitare l'inserimento dei dati grezzi e il calcolo delle statistiche riassuntive. Inoltre, sono fornite tabelle intese a facilitare la comunicazione delle sintesi dei dati riguardanti i parametri sottoposti a valutazione. Le tabelle per la registrazione delle valutazioni istologiche sono disponibili nell'appendice 2.

Criteri di esecuzione e accettabilità/validità della prova

44. In generale, le deviazioni sostanziali rispetto al metodo di prova si traducono in dati che non sono accettabili ai fini dell'interpretazione e della comunicazione. Pertanto, i criteri seguenti, riportati nella tabella 4, sono stati elaborati come guida per determinare la qualità della prova eseguita e dei risultati generali ottenuti con gli organismi di controllo.

Tabella 4**Criteri di esecuzione per la Prova sulla metamorfosi degli anfibi**

Criterio	Limiti di accettabilità
Concentrazioni sperimentali	Mantenuti a < 20 % VC (variabilità della concentrazione misurata) nei 21 giorni della prova
Mortalità fra i controlli	≤ 10 % — la mortalità dei girini in una qualsiasi replica è di ≤ 2
Stadio di sviluppo mediano minimo fra i controlli alla fine della prova	57
Ripartizione dello stadio di sviluppo nel gruppo di controllo	Gli individui che corrispondono rispettivamente al 10° e al 90° percentile della distribuzione dello stadio di sviluppo non presentano una differenza di oltre 4 stadi
Ossigeno dissolto	≥ 40 % del valore di saturazione dell'aria (*)

Criterio	Limiti di accettabilità
pH	Il pH è compreso tra 6,5 e 8,5. I differenziali interreplica/intertrattamento non devono superare 0,5.
Temperatura dell'acqua	22 ± 1 °C — I differenziali interreplica/intertrattamento non devono superare 0,5 °C.
Concentrazioni sperimentali senza tossicità evidente	≥ 2
Funzionamento delle repliche	≤ 2 repliche nell'insieme della prova possono essere compromesse
Condizioni particolari per l'uso di un solvente	<p>Se si utilizza un solvente vettore, occorre utilizzare un campione di controllo con il solvente e un controllo con acqua pulita, e registrare i risultati.</p> <p>Le differenze statisticamente significative tra i gruppi di controllo per il solvente e per l'acqua vengono tratte in modo specifico. Cfr. infra per maggiori informazioni</p>
Condizioni particolari per il ricorso ad un sistema con ricambio statico	<p>Le analisi chimiche rappresentative effettuate prima e dopo il ricambio sono registrate</p> <p>Il tenore d'ammoniaca è calcolato immediatamente prima del ricambio</p> <p>Tutti i parametri relativi alla qualità dell'acqua elencati nella tabella 1 dell'appendice 1 sono misurati immediatamente prima del ricambio</p> <p>L'intervallo di tempo tra due ricambi non supera 72 ore</p> <p>Un programma di alimentazione adatto (50 % della razione giornaliera di mangimi commerciali per girini).</p>

(*) L'aerazione dell'acqua può essere mantenuta tramite gorgogliatori, che si raccomanda di collocare ad un livello tale da non sottoporre i girini a stress eccessivo.

Validità della prova

45. Per essere considerata accettabile/valida la prova deve soddisfare i seguenti requisiti:

condizioni di validità di un test perché si possa considerare che i risultati relativi all'attività sulla tiroide sono negativi:

(1) per tutti i livelli di concentrazione considerati (compresi quelli di controllo), la mortalità non supera il 10 %. Per ciascuna replica la mortalità non può superare il numero di tre girini; in caso contrario la replica è considerata compromessa;

(2) almeno due livelli di trattamento, comprese tutte e 4 le repliche non compromesse, sono disponibili per l'analisi;

(3) almeno due livelli di trattamento privi di tossicità evidente sono disponibili per l'analisi;

condizioni di validità di un test perché si possa considerare che i risultati relativi all'attività sulla tiroide sono positivi:

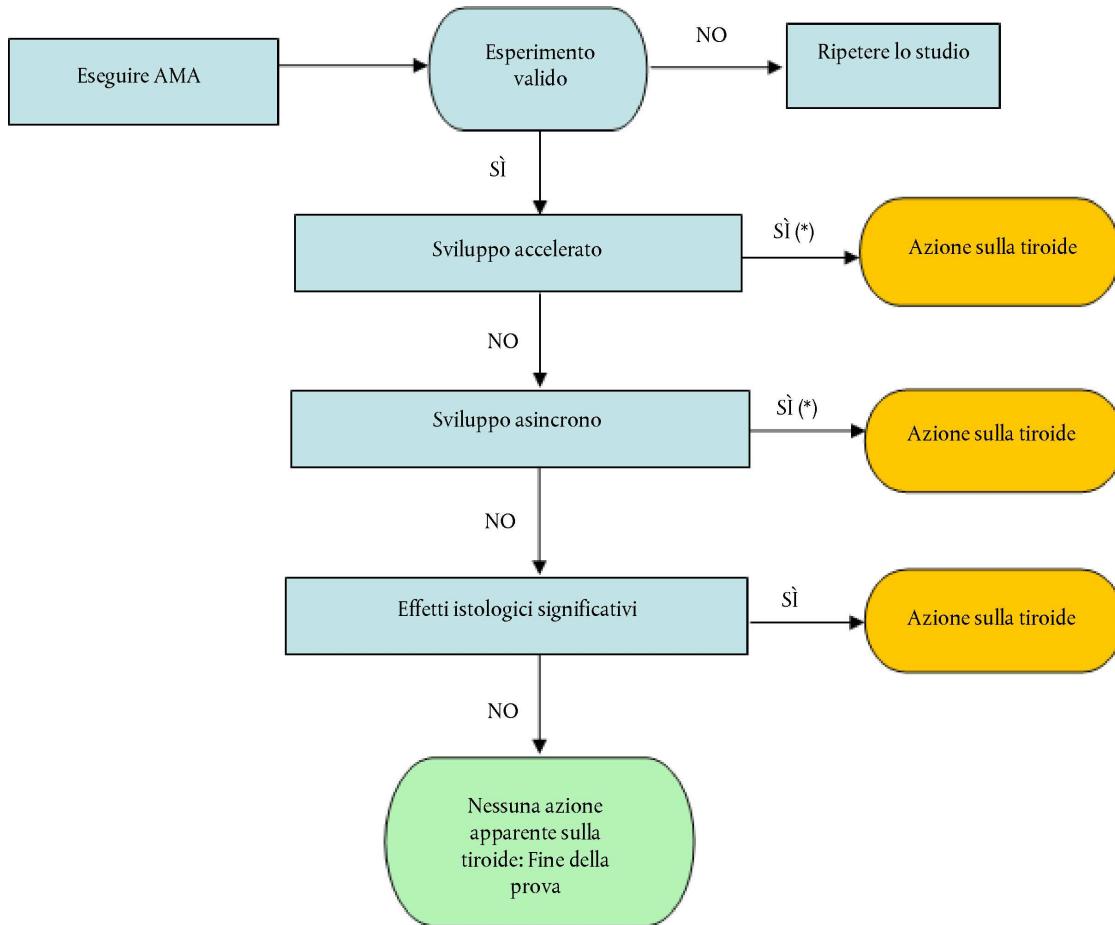
(1) la mortalità osservata è limitata a non più di due girini/replica nel gruppo di controllo.

Diagramma decisionale per la conduzione della prova sulla metamorfosi degli anfibi

46. Un diagramma decisionale è stato elaborato affinché la prova sulla metamorfosi degli anfibi fornisca sostegno logico nella conduzione e nell'interpretazione dei risultati del biosaggio (cfr. diagramma decisionale riportato nella figura 3). Fondamentalmente, la logica decisionale interpreta gli endpoint accordando un forte fattore di ponderazione ai casi osservati di sviluppo accelerato, sviluppo asincrono e istopatologia tiroidea, mentre accorda una bassa ponderazione allo sviluppo ritardato, alla lunghezza dall'apice del muso alla cloaca e al peso del corpo umido, parametri che possono potenzialmente essere influenzati dalla tossicità generale.

Figura 3

Diagramma decisionale per la conduzione della Prova sulla metamorfosi degli anfibi.



(*) Alcune autorità di regolamentazione possono chiedere l'istologia, nonostante l'osservazione di differenze significative nello sviluppo accelerato e asincrono. L'organismo incaricato della prova è invitato a consultare le autorità competenti prima dell'inizio della prova, al fine di determinare quali siano i parametri da sottoporre a valutazione.

Sviluppo accelerato (determinato in base allo stadio di sviluppo, la SVL e la lunghezza delle zampe posteriori)

47. È risaputo che lo sviluppo accelerato è dovuto unicamente alle conseguenze relative agli ormoni tiroidei. Tra gli effetti figurano quelli sui tessuti periferici, ad esempio l'interazione diretta con i recettori degli ormoni tiroidei (T4), o gli effetti che alterano i livelli di ormoni tiroidei in circolazione. In entrambi i casi tali effetti sono ritenuti sufficienti per concludere che la sostanza chimica agisce sull'attività tiroidea. Lo sviluppo accelerato è valutato in uno dei due modi seguenti: a) lo stadio di sviluppo generale può essere valutato utilizzando il metodo standardizzato descritto in Nieuwkoop e Faber (8); oppure b) i caratteri morfologici specifici possono essere quantificati, ad esempio la lunghezza delle zampe posteriori, il 7° e 21° giorno, poiché tale criterio risulta positivamente associato agli effetti agonisti dei recettori degli ormoni tiroidei. Se si manifestano accelerazioni dello sviluppo o la crescita delle zampe posteriori statisticamente significative, la prova indica che la sostanza chimica è attiva sulla tiroide.
48. La valutazione di un eventuale sviluppo accelerato negli animali sperimentali rispetto alla popolazione di controllo si basa sui risultati delle analisi statistiche condotte sui quattro parametri seguenti:
 - lunghezza delle zampe posteriori (normalizzata dalla SVL) al 7° giorno dello studio
 - lunghezza delle zampe posteriori (normalizzata dalla SVL) al 21° giorno dello studio
 - stadio di sviluppo al 7° giorno dello studio
 - stadio di sviluppo al 21° giorno dello studio.
49. Le analisi statistiche riguardanti la lunghezza delle zampe posteriori vanno basate sulle misurazioni della lunghezza della zampa posteriore sinistra. La normalizzazione della lunghezza delle zampe posteriori avviene sulla base del rapporto tra la lunghezza delle zampe posteriori e la lunghezza dall'apice del muso alla cloaca per ciascun individuo. Sono quindi confrontate le medie dei valori normalizzati per ciascun livello di trattamento. L'accelerazione dello sviluppo è segnalata da un forte incremento della media delle lunghezze delle zampe posteriori (normalizzate) misurate nel gruppo trattato chimicamente, rispetto a quella del gruppo di controllo, il 7° e/o 21° giorno dello studio (cfr. appendice 3).
50. Le analisi statistiche dello stadio di sviluppo vanno basate sulla determinazione degli stadi di sviluppo conformemente ai criteri morfologici descritti da Nieuwkoop e Faber (8). Vi è presenza di un'accelerazione dello sviluppo quando l'analisi multi-quantale rileva un drastico aumento dei valori degli stadi di sviluppo nel gruppo trattato chimicamente, rispetto a quelli del gruppo di controllo, il 7° e/o 21° giorno dello studio.
51. Nel metodo di prova sulla metamorfosi degli anfibi, un effetto significativo osservato in uno qualsiasi dei quattro parametri sopra elencati è considerato sufficiente per comprovare uno sviluppo accelerato. Vale a dire che gli effetti significativi sulla lunghezza delle zampe posteriori rilevati in un dato momento non hanno bisogno di essere ulteriormente confermati dalla presenza della stessa tendenza in un altro momento né da effetti significativi sullo stadio di sviluppo nello stesso momento. Analogamente, gli effetti significativi sullo stadio di sviluppo osservati in un dato momento non hanno bisogno di essere confermati dalla presenza di effetti significativi sullo stadio di sviluppo in un altro momento né da effetti significativi sulla lunghezza delle zampe posteriori nello stesso momento. Tuttavia, se si rilevano effetti significativi su più di un parametro, le prove a favore di uno sviluppo accelerato risultano rafforzate.

Sviluppo asincrono (determinato in base al criterio dello stadio di sviluppo)

52. Uno sviluppo asincrono è caratterizzato da uno sfasamento nel ritmo della morfogenesi o dello sviluppo di diversi tessuti nello stesso girino. L'impossibilità di stabilire chiaramente lo stadio di sviluppo di un individuo basandosi sulla serie di parametri morfologici considerati tipici di un determinato stadio indica che i tessuti si stanno sviluppando in modo asincrono, attraverso la metamorfosi. Uno sviluppo asincrono è indicativo di attività sulla tiroide. Gli unici meccanismi d'azione conosciuti che causano tale disfunzione consistono negli effetti delle sostanze chimiche sull'azione periferica e/o il metabolismo relativi agli ormoni tiroidei nei tessuti in fase di sviluppo, come dimostrato con gli inibitori della deiodinasi.
53. La valutazione dello sviluppo asincrono negli animali sperimentali rispetto al gruppo di controllo si basa sull'esame morfologico macroscopico effettuato il 7° e 21° giorni dello studio.
54. La descrizione dello sviluppo normale della specie *Xenopus laevis* secondo Nieuwkoop e Faber (8) costituisce il quadro di riferimento per individuare l'ordine sequenziale del normale rimodellamento dei tessuti. Il termine "sviluppo asincrono" si riferisce specificamente a quelle deviazioni nello sviluppo morfologico generale dei

girini che impediscono di stabilire in modo definitivo lo stadio di sviluppo in base ai criteri indicati da Nieuwkoop e Faber (8), perché i riferimenti morfologici fondamentali manifestano le caratteristiche di stadi diversi.

55. Come indicato nel termine “sviluppo asincrono”, vanno presi in considerazione solo i casi che presentano deviazioni nella sequenza del rimodellamento di specifici tessuti rispetto alla sequenza del rimodellamento di altri tessuti. Tra i fenotipi classici figurano il ritardato o il mancato sviluppo delle zampe anteriori nonostante lo sviluppo normale o accelerato dei tessuti delle zampe posteriori e della coda, oppure il riassorbimento precoce delle branchie rispetto allo stadio di morfogenesi delle zampe posteriori e al riassorbimento della coda. Un animale sarà registrato come soggetto a sviluppo asincrono se non è possibile stabilire in quale stadio di sviluppo si trova perché non si conforma alla maggior parte dei criteri di Nieuwkoop e Faber (8), o se si riscontra un ritardo o un’accelerazione estremi di una o più caratteristiche fondamentali (ad esempio la coda è completamente riassorbita mentre le zampe anteriori non si sono sviluppate). Tale valutazione è di natura qualitativa e integra tutte le caratteristiche di riferimento elencate da Nieuwkoop e Faber (8). Tuttavia non è necessario registrare lo stato di sviluppo di ciascuna di tali caratteristiche di riferimento negli animali osservati. Gli esemplari nei quali viene diagnosticato uno sviluppo asincrono non sono assegnati a uno stadio di sviluppo secondo Nieuwkoop e Faber (8).
56. Pertanto, uno dei principali criteri per designare i casi di sviluppo morfologico anormale come “sviluppo asincrono”, consiste nello sfasamento temporale fra il ritmo della rimodellazione dei tessuti e quello della morfogenesi dei tessuti, benché la morfologia dei tessuti interessati non presenti anomalie evidenti. Un esempio che illustra questa interpretazione delle anomalie morfologiche evidenti è che il ritardo nella morfogenesi delle zampe posteriori rispetto allo sviluppo di altri tessuti è sufficiente a concludere che ci si trova in presenza di uno “sviluppo asincrono”, contrariamente ai casi di assenza delle zampe posteriori, di anomalie digitali (ad esempio, ectrodattilia, polidattilia) e di altre evidenti malformazioni degli arti.
57. In questo contesto, i principali criteri morfologici da valutare in termini di evoluzione metamorfica coordinata comprendono la morfogenesi delle zampe posteriori e anteriori, la comparsa delle zampe anteriori, lo stadio di riassorbimento della coda (in particolare il riassorbimento della pinna caudale) e la morfologia della testa (ad esempio le dimensioni delle branchie e lo stadio in cui sono riassorbite, la morfologia della mandibola, o la protrusione della cartilagine di Meckel).
58. In funzione del meccanismo d’azione della sostanza chimica, possono apparire diversi fenotipi morfologici macroscopici. Alcuni fenotipi classici includono il ritardo o l’assenza della comparsa delle zampe anteriori nonostante uno sviluppo normale o accelerato delle zampe posteriori e dei tessuti della coda, il riassorbimento precoce delle branchie rispetto alle zampe posteriori e il rimodellamento della coda.

Esame istopatologico

59. Se la sostanza chimica non presenta una tossicità evidente e non induce un’accelerazione o un’asincronia dello sviluppo, l’istopatologia della tiroide è valutata con riferimento all’apposito documento di orientamento (9). In assenza di tossicità, il ritardo di sviluppo è un forte indicatore di attività antitiroidea. Tuttavia l’analisi dello stadio di sviluppo è meno sensibile e meno efficace nell’indicazione diagnostica rispetto all’analisi istopatologica della tiroide. In questo caso, pertanto, l’analisi istopatologica della tiroide si rende necessaria. Sono stati dimostrati effetti sull’istologia della tiroide anche in mancanza di effetti sullo sviluppo. Qualora si osservino alterazioni nell’istopatologia della tiroide, si considera che la sostanza chimica agisce sulla tiroide. Se invece non si osservano lesioni istologiche alla tiroide né ritardo di sviluppo, la sostanza chimica è considerata inattiva sulla tiroide. La ragione di questa decisione è che la tiroide è sotto l’influenza dell’ormone tireostimolante (TSH) e che qualsiasi sostanza chimica che altera la circolazione degli ormoni tiroidei in modo sufficiente da alterare la secrezione di TSH comporta cambiamenti istopatologici nella tiroide. Vari meccanismi e modalità d’azione possono alterare la circolazione degli ormoni tiroidei. Pertanto, benché il livello degli ormoni tiroidei sia indicativo di un effetto sulla tiroide, tale dato non basta a determinare quale sia il meccanismo o la modalità d’azione connessa alla risposta.
60. Poiché questo parametro non si presta all’applicazione dei metodi statistici di base, per determinare se un effetto è risultante dall’esposizione a una sostanza chimica si deve ricorrere al parere specializzato di un patologo.

Ritardo di sviluppo (determinato in base allo stadio di sviluppo, la lunghezza delle zampe posteriori e la SVL)

61. Ritardi di sviluppo possono essere determinati da meccanismi antitiroidei o tossicità indiretta. Leggeri ritardi di sviluppo associati a segni evidenti di tossicità indicano un effetto tossico non specifico. La valutazione della tossicità non legata alla tiroide costituisce un elemento essenziale della prova, al fine di ridurre la probabilità di

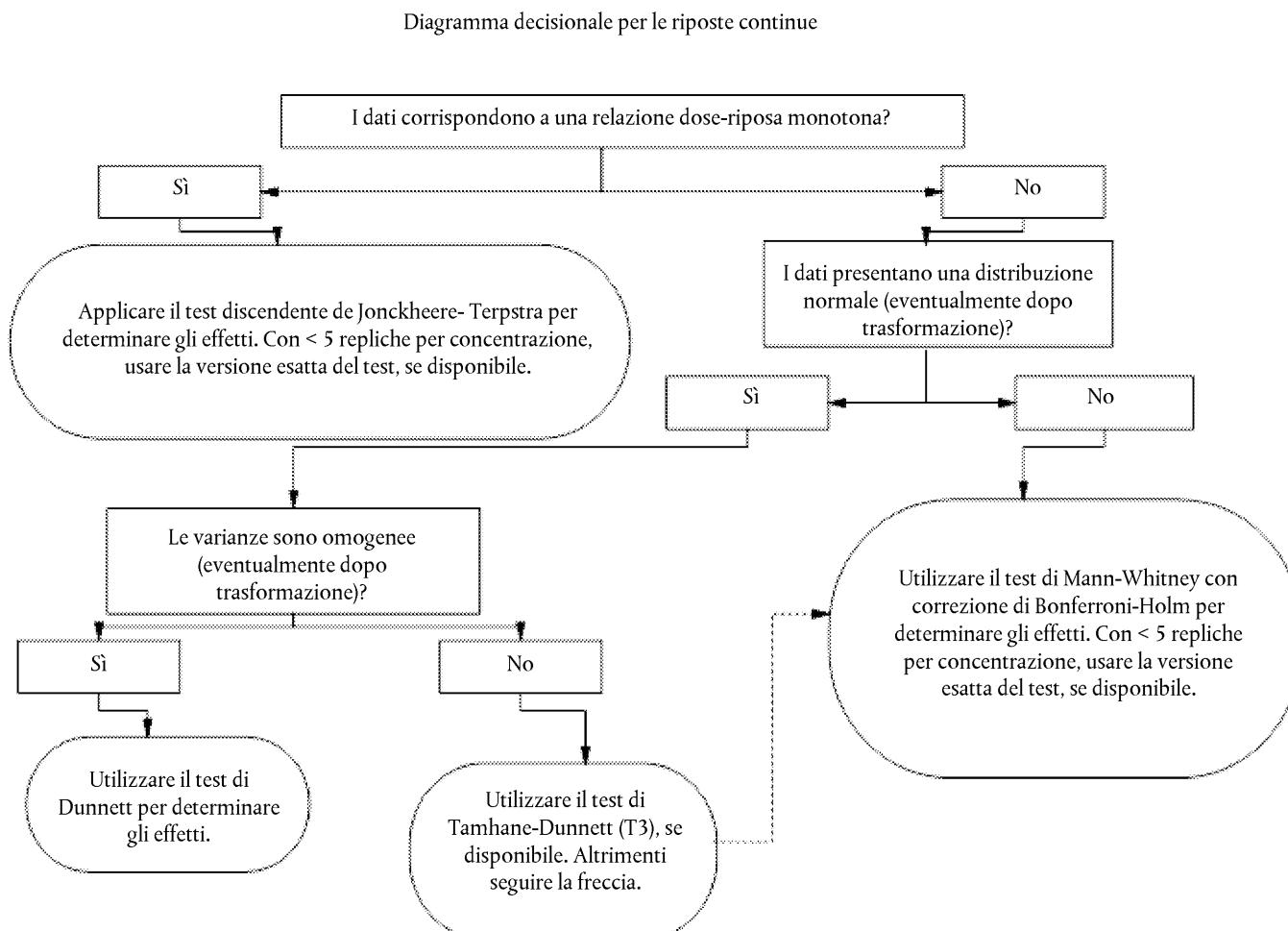
comparsa di falsi positivi. Una mortalità eccessiva è una chiara indicazione della presenza di meccanismi tossici. Analogamente, lievi ritardi di crescita, valutati utilizzando il peso umido e/o la SVL, suggeriscono una tossicità non legata alla tiroide. Si osserva spesso un aumento apparente della crescita con le sostanze chimiche che influiscono negativamente sul normale sviluppo. La presenza di animali più sviluppati non implica quindi necessariamente una tossicità non tiroidea. Tuttavia, la crescita non deve essere l'unico elemento su cui si basa la determinazione della tossicità sulla tiroide. Piuttosto, per valutare l'attività sulla tiroide, la crescita deve essere analizzata congiuntamente allo stadio di sviluppo e all'istopatologia della tiroide. Per determinare la tossicità evidente vanno presi in considerazione anche altri parametri, compresi edemi, lesioni emorragiche, letargia, diminuzione del consumo di cibo, comportamento natatorio erratico/alterato, ecc. Se tutte le concentrazioni testate esprimono una tossicità evidente, si deve rivalutare la sostanza chimica in esame a concentrazioni inferiori prima di stabilire se la sostanza chimica è attiva o inattiva sulla tiroide.

62. In assenza di altri segni di tossicità evidente, i ritardi di sviluppo statisticamente significativi indicano che la sostanza chimica è attiva (con un meccanismo antagonista) sulla tiroide. Inoltre, in mancanza di risposta statisticamente marcata, tale osservazione può essere integrata con i risultati dell'istopatologia della tiroide.

Analisi statistiche

63. È preferibile effettuare le analisi statistiche secondo le procedure descritte nel documento intitolato *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity data: A Guidance to Application* (11). Per quanto riguarda tutti i parametri quantitativi continui (lunghezza delle zampe posteriori, SVL, peso umido) con una relazione dose-risposta monotona, occorre applicare il test discendente Jonckheere — Terpstra per stabilire se esiste un effetto statisticamente significativo di esposizione alla sostanza chimica.
64. Per i parametri continui non compatibili con una relazione dose-risposta monotona, i dati sono esaminati in termini di normalità (preferibilmente con i test Shapiro-Wilk o Anderson-Darling) e di omogeneità della varianza (preferibilmente con il test di Levene). Entrambi i test utilizzano i dati residui di un'ANOVA. È possibile sostituire con il giudizio di un esperto tali test formali di normalità e omogeneità della varianza, ma questi ultimi sono comunque preferibili. In caso di "non normalità" o di "eterogeneità della varianza" si deve ricorrere a una trasformazione normalizzatrice e stabilizzatrice della varianza. Se i dati (eventualmente previa trasformazione) presentano una distribuzione normale con una varianza omogenea, il test di Dunnett evidenzia se il trattamento produce effetti significativi. Se i dati (eventualmente previa trasformazione) presentano una distribuzione normale con una varianza eterogenea, gli effetti significativi causati dal trattamento sono determinati mediante test di Tamhane-Dunnett o il test T3, oppure con il test U di Mann-Whitney-Wilcoxon. Nel caso in cui non si ottenga alcuna trasformazione normalizzatrice, gli effetti significativi del trattamento sono determinati mediante il test U di Mann-Whitney-Wilcoxon con correzione di Bonferroni-Holm ai valori p. Il test di Dunnett si applica indipendentemente dal test F ANOVA e il test Mann-Whitney si applica indipendentemente da qualsiasi test globale di Kruskal-Wallis.
65. Non è prevista alcuna mortalità significativa, che tuttavia occorre valutare con il test discendente di Cochran-Armitage quando i dati presentano una relazione dose-risposta monotona; negli altri casi, applicare il test esatto di Fisher con una correzione di Bonferroni-Holm.
66. Un eventuale effetto significativo causato dal trattamento sullo stadio di sviluppo è determinato mediante il test discendente di Jonckheere-Terpstra applicato alle mediane delle repliche. In alternativa si può ricorrere all'analisi multi-quantale di Jonckheere basandosi sui risultati compresi tra il 20° e l'80° percentile; poiché questo metodo tiene conto dei cambiamenti nel profilo di distribuzione, è preferibile agli altri.
67. L'unità di analisi adeguata è la replica: pertanto, se si applica il test di Jonckheere-Terpstra o il test U di Mann-Whitney si otterranno le mediane delle repliche, mentre se si applica il test di Dunnett si otterranno le medie delle repliche. È possibile valutare visivamente il carattere monotono della relazione dose-risposta esaminando le medie o le mediane delle repliche e dei trattamenti, oppure mediante i test formali descritti in precedenza (11). Se il numero di repliche per i controlli o i trattamenti è inferiore a cinque, si deve ricorrere, se disponibili, alle versioni di permutazione esatta dei test di Jonckheere-Terpstra e Mann-Whitney. In tutti i test menzionati il livello di significatività da considerare per valutare la significatività statistica è 0,05.
68. Il diagramma della figura 4 serve a stabilire quali test statistici eseguire sui dati continui.

Figura 4

Diagramma per determinare il metodo statistico da applicare alle risposte continue

Considerazioni specifiche relative all'analisi dei dati

Livelli di esposizione compromessi

69. Diversi fattori vanno considerati al fine di stabilire se una replica o un trattamento presentano una tossicità evidente e se è pertanto opportuno escluderli dall'analisi. Si considera che esiste tossicità evidente in una replica in presenza di una mortalità imputabile unicamente alla tossicità — e non ad errore tecnico — superiore a due individui. Altri sintomi di tossicità evidente comprendono l'emorragia, i comportamenti anomali, l'inappetenza, i movimenti natatori anomali, nonché qualunque altro segno clinico di malattia. Per individuare i segnali di tossicità subletale si rende a volte necessario ricorrere a valutazioni qualitative, sempre eseguite rispetto al gruppo di controllo in acqua pulita.

Gruppo di controllo con solvente

70. Il ricorso al solvente deve essere preso in considerazione soltanto come ultima istanza, dopo aver considerato tutte le altre opzioni di distribuzione della sostanza chimica. Se si utilizza un solvente, è necessario condurre un esame su un controllo con acqua pulita in parallelo. Al completamento della prova, vanno valutati i potenziali effetti del solvente, mediante un confronto statistico tra il gruppo di controllo con solvente e il gruppo di controllo con acqua pulita. I principali parametri da valutare in questo contesto sono lo stadio di sviluppo, la SVL ed il peso umido, poiché essi sono sensibili alla tossicità non tiroidea. In caso di differenze statisticamente significative in tali parametri tra i gruppi di controllo con solvente e i gruppi di controllo con acqua pulita, i valori dei parametri di risposta misurati nello studio sono determinati utilizzando il gruppo di controllo con acqua pulita. Se, al contrario, non vi sono differenze statisticamente significative tra i due gruppi per tutte le variabili misurate, i valori dei parametri di risposta misurati nello studio sono determinati mediante l'aggregazione dei gruppi di controllo con l'acqua di diluizione e di quelli di controllo con solvente.

Gruppi di trattamento che raggiungono uno stadio di sviluppo uguale o superiore a 60

71. Dopo lo stadio 60, il peso e le dimensioni dei girini diminuiscono a causa del riassorbimento dei tessuti e della riduzione della massa di acqua in valore assoluto. Pertanto le misurazioni del peso umido e della SVL non possono più essere adeguatamente utilizzate nelle analisi statistiche delle differenze del tasso di crescita. I valori del peso umido e la lunghezza degli animali in uno stadio secondo NF superiore a 60 vanno pertanto esclusi e non possono essere utilizzati nelle analisi delle medie o mediane delle repliche. Sono possibili due approcci diversi per analizzare i parametri di crescita.
72. Un approccio consiste nel prendere in considerazione unicamente i girini ad uno stadio di sviluppo inferiore o pari a 60 per le analisi statistiche del peso umido e/o dalla SVL. Si ritiene che tale approccio fornisca informazioni sufficientemente valide sulla gravità dei potenziali effetti sulla crescita, a condizione che la percentuale di animali esclusi dall'analisi sia limitata ($\leq 20\%$). Se il numero di girini ad uno stadio di sviluppo superiore a 60 è maggiore ($\geq 20\%$) in una o più concentrazioni nominali, si dovrà procedere ad un'analisi ANOVA a due fattori con struttura di varianza gerarchica su tutti i girini per valutare gli effetti sulla crescita dovuti ai trattamenti chimici, pur prendendo in considerazione l'effetto degli stadi di sviluppo avanzati sulla crescita. L'appendice 3 fornisce orientamenti per l'analisi ANOVA a due fattori del peso e della lunghezza.

BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (2004) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 — Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 77, Paris.
- (2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 — Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 76. Paris
- (3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 92. Paris
- (4) OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 23. Paris

-
- (5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002), Philadelphia, PA
 - (6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay — Xenopus (FETAX). E 1439-98
 - (7) Kahl,M.D., Russom,C.L., DeFoe,D.L. & Hammermeister,D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, pp. 539-551.
 - (8) Nieuwkoop,P.D. & Faber,J. (1994) Normal Table of Xenopus laevis. Garland Publishing, New York
 - (9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 82. Paris
 - (10) Dodd,M.H.I. & Dodd,J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts,B. (ed.), Academic Press, New York, pp. 467-599
 - (11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 54. Paris
 - (12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: Revisione critica. Riesame: Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

Appendice 1

Tabella 1

Condizioni sperimentali della Prova sulla metamorfosi degli anfibi in 21 giorni

Animali sperimentali	Larve della specie <i>Xenopus laevis</i>	
Stadio larvale iniziale	Stadio 51 secondo Nieuwkoop e Faber	
Durata dell'esposizione:	21 giorni	
Criteri di selezione	Stadio di sviluppo e lunghezza totale (facoltativa)	
Concentrazioni della sostanza chimica in esame	Minimo 3 concentrazioni che coprono approssimativamente un ordine di grandezza	
Regime di esposizione	A flusso continuo (preferito) e/o con ricambio statico	
Portata del flusso del sistema sperimentale	25 ml/min (ricambio completo del volume ca. ogni 2,7 ore)	
Endpoint primari / calendario delle osservazioni	Mortalità	Una volta al giorno
	Stadio di sviluppo	G 7 e 21
	Lunghezza delle zampe posteriori	G 7 e 21
	Lunghezza dall'apice del muso alla cloaca	G 7 e 21
	Peso del corpo umido	G 7 e 21
	Istologia della tiroide	G 21
Acqua di diluizione / campione di controllo del laboratorio	Acqua di rubinetto non clorata (filtrata su carbone) o fonte di laboratorio equivalente	
Densità delle larve	20 larve / vasca di prova (5 / l)	
Soluzione di prova / recipiente di prova	4-10 l (10-15 cm min. di acqua) / recipiente di prova in vetro o acciaio inossidabile (ad es. 22,5 cm x 14 cm x 16,5 cm)	
Repliche	4 repliche dei recipienti di prova per concentrazione sperimentale e per ciascun controllo	
Tasso di mortalità accettabile nei controlli	$\leq 10\%$ per replica dei recipienti di prova	
Fissazione della tiroide	Numero fissato	Tutti i girini (5/replica valutati inizialmente)
	Regione	Testa o corpo intero
	Fluido di fissazione	Fissativo di Davidson

Alimentazione	Mangime	Sera Micron® o equivalente
	Quantità / Frequenza	V. Tabella 1 per il regime alimentare con mangime Sera Micron®
Illuminazione	Periodo di esposizione luminosa	12 ore di luce e 12 ore di oscurità
	Intensità	Da 600 a 2 000 lux (misurata alla superficie dell'acqua)
Temperatura dell'acqua		22° ± 1 °C
pH		6,5 — 8,5
Concentrazione dell'ossigeno dissolto:		>3,5 mg/l (>40 % del valore di saturazione dell'aria)
Programma di campionamento per le analisi chimiche		Una volta a settimana (4 campionamenti/prova)

*Appendice 2***Tabella per la relazione dei dati grezzi e riassuntivi***Tabella 1***Informazioni generali sulla sostanza chimica in esame**

Informazioni sulla sostanza chimica in esame		
Registrare la sostanza chimica, le unità di concentrazione e i trattamenti		
Sostanza chimica in esame:		
Unità di concentrazione		
Trattamento 1		
Trattamento 2		
Trattamento 3		
Trattamento 4		
Giorno (giorno 0):		Inserire la data (gg/mm/aa)
Giorno (giorno 7):		Inserire la data (gg/mm/aa)
Giorno (giorno 21):		Inserire la data (gg/mm/aa)

*Tabella 2***Tabella di raccolta dei dati grezzi per i giorni 7 e 21****GIORNO X****Data 00/00/00**

	Concen-trazione	Numero di tratta-mento	Numero della re-pllica	Numero indivi-duale	Identifica-tore indivi-duale	Stadio di sviluppo	Lunghezza SVL (mm)	Lunghezza delle zampe po-steriori (mm)	Peso del corpo umido (mg)
RIGA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIO	BL	HHL	PESO
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							

	Concen-trazione	Numero di trattamen-to	Numero della re-pllica	Numero indivi-duale	Identifica-tore indivi-duale	Stadio di sviluppo	Lunghezza SVL (mm)	Lunghezza delle zampe po-steriori (mm)	Peso del corpo umido (mg)
RIGA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIO	BL	HHL	PESO
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							
32	0,00	2							

	Concen-trazione	Numero di tratta-mento	Numero della re-plica	Numero indivi-duale	Identifica-tore indi-viduale	Stadio di sviluppo	Lunghezza SVL (mm)	Lunghezza delle zampe po-steriori (mm)	Peso del corpo umido (mg)
RIGA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIO	BL	HHL	PESO
33	0,00	2							
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							
59	0,00	3							
60	0,00	3							

	Concen-trazione	Numero di tratta-mento	Numero della re-pllica	Numero indivi-duale	Identifica-tore indivi-duale	Stadio di sviluppo	Lunghezza SVL (mm)	Lunghezza delle zampe po-steriori (mm)	Peso del corpo umido (mg)
RIGA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIO	BL	HHL	PESO
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

Tabella 3

Dati riassuntivi calcolati per le osservazioni dei giorni 7 e 21

		Stadio di sviluppo			SVL (mm)		Lunghezza delle zampe posteriori (mm)		Peso (kg)	
TRT	REP	MIN	MEDIA-NA	MAX	MEDIA	DEV STD	MEDIA	DEV STD	MEDIA	DEV STD
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Nota: I calcoli delle caselle sono associati ai dati riportati nella tabella 2

Tabella 4

Dati di mortalità giornaliera

Giorno di prova	Data	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#VALORE!																
2	#VALORE!																
3	#VALORE!																
4	#VALORE!																
5	#VALORE!																
6	#VALORE!																
7	#VALORE!																
8	#VALORE!																
9	#VALORE!																
10	#VALORE!																
11	#VALORE!																
12	#VALORE!																
13	#VALORE!																
14	#VALORE!																
15	#VALORE!																
16	#VALORE!																
17	#VALORE!																
18	#VALORE!																
19	#VALORE!																
20	#VALORE!																
21	#VALORE!																
Somma per replica		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Somma per trattamento		0				0				0				0			

Nota: I calcoli delle caselle sono associati ai dati riportati nella tabella 1

Tabella 5

Criteri di qualità dell'acqua

Sistema di esposizione (flusso continuo/ricambio statico):

Temperatura:

Intensità luminosa:

Ciclo luce-buio:

Mangimi:

Regime alimentare:

pH dell'acqua:

Concentrazione di iodio nella soluzione di prova:

Tabella 6

Sintesi dei dati chimici

Denominazione chimica:

Numero Cas #:

Denominazione chimica:

Numero Cas #:

Giorno di prova	Data	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
6	#VALORE!																				
7	#VALORE!																				
8	#VALORE!																				
9	#VALORE!																				
10	#VALORE!																				
11	#VALORE!																				
12	#VALORE!																				
13	#VALORE!																				
14	#VALORE!																				
15	#VALORE!																				
16	#VALORE!																				
17	#VALORE!																				
18	#VALORE!																				
19	#VALORE!																				
20	#VALORE!																				
21	#VALORE!																				

Nota: I calcoli delle caselle sono associati ai dati riportati nella tabella 1.

Tabella 7

Tabelle dei risultati relativi ai criteri istopatologici fondamentali

Data

Sostanza chimica:

Patologo

Tabella 8

Altri criteri istopatologici

Data

Sostanza chimica

Patologo

Tabella 9

Descrizione delle osservazioni istopatologiche

Data

Sostanza chimica:

Patologo

Descrizione

ID animale campione di controllo — Replica 1		
ID animale campione di controllo — Replica 2		
ID animale esposto a trattamento — Replica 1		
ID animale esposto a trattamento — Replica 2		

Tabella 10

Tabella riassuntiva dei dati per il giorno x (7 o 21) della Prova di metamorfosi degli anfibi

Tabella 11

Tabella riassuntiva dei dati relativi allo stadio di sviluppo per il giorno x (7 o 21) della Prova di metamorfosi degli anfibi

Appendice 3

Metodi alternativi di analisi del peso e della lunghezza quando più del 20 % dei girini si trova in uno stadio di sviluppo avanzato a una o più concentrazioni

Se un numero maggiore ($\geq 20\%$) di girini presenta uno stadio di sviluppo superiore a 60 a una o più concentrazioni nominali, si dovrà eseguire un'analisi ANOVA a due fattori con una struttura della varianza gerarchica su tutti i girini per valutare gli effetti sulla crescita dovuti ai trattamenti chimici, tenendo conto dell'effetto dello stadio di sviluppo avanzato sulla crescita.

Si tratta di utilizzare tutti i dati ma di tener ugualmente conto dello stadio di sviluppo avanzato. A tal fine, si utilizza un'analisi ANOVA a due fattori con struttura della varianza gerarchica. Si definisca il criterio "Stadio avanzato" (*LateStage*) = "Sì" per gli animali che si trovano in uno stadio di sviluppo superiore o uguale a 61. In caso contrario, il criterio "Stadio avanzato" = "NO". Si può quindi procedere ad un'analisi ANOVA a due fattori sulle interazioni tra la concentrazione e lo "Stadio avanzato", utilizzando Rep(Conc) come fattore casuale e Girino(Rep) come altro effetto casuale. Questo metodo continua a trattare la replica come unità di analisi, e fornisce fondamentalmente gli stessi risultati di un'analisi delle medie "Rep*latestage", ponderata per il numero di animali per media. Se i dati non soddisfano i requisiti di ANOVA per la normalità e l'omogeneità della varianza, si può ricorrere a una trasformazione in ranghi normalizzata per risolvere il problema.

In aggiunta ai test F ANOVA classici per gli effetti "Conc", "Stadio avanzato" e le loro interazioni, il test F di interazione può essere suddiviso in due test F di ANOVA supplementari, uno incentrato sulle risposte medie ottenute su tutte le concentrazioni con il criterio "Stadio avanzato" = "NO", mentre il secondo si basa sulle risposte medie ottenute su tutte le concentrazioni con il criterio "Stadio avanzato" = "Sì". Ulteriori confronti tra le medie dei diversi livelli di esposizione rispetto al gruppo di controllo sono condotte all'interno di ciascun livello di "Stadio avanzato". Se si evidenzia una relazione dose-risposta non monotona in uno dei livelli caratterizzati dal criterio "Stadio avanzato" si può effettuare un'analisi delle tendenze utilizzando i contrasti appropriati o confronti semplici a coppie. Una correzione secondo Bonferroni-Holm ai valori p è necessaria solo se la parte corrispondente del test F non è significativa. Tali operazioni possono essere eseguite in SAS e, probabilmente, altri software statistici. Possono insorgere complicazioni se, per determinate concentrazioni, nessun animale presenta uno stadio di sviluppo avanzato. Tuttavia tali situazioni possono essere risolte con un approccio pragmatico.

*Appendice 4***Definizioni**

Sostanza chimica: sostanza o miscela

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela saggiata seguendo il presente metodo di prova

C.39. PROVA DI RIPRODUZIONE DI COLLEMBOLI IN CAMPIONI DI SUOLO

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 232 (2009). Il presente metodo di prova è inteso a valutare gli effetti delle sostanze chimiche sulla riproduzione dei Collemboli in campioni di suolo e si basa su procedure esistenti (1) (2). La *Folsomia candida*, che si riproduce per partenogenesi, e la *Folsomia fimetaria*, a riproduzione sessuata, sono due delle specie più diffuse dell'ordine dei Collemboli; possono essere coltivate e sono disponibili in commercio. Quando devono essere valutati habitat specifici che non sono occupati da nessuna di queste due specie, il metodo può anche essere esteso ad altre specie di Collemboli, se si conformano ai criteri di validità del test.
2. I Collemboli che vivono nel suolo sono specie ecologicamente pertinenti ai fini delle prove di ecotossicità. Si tratta di insetti esapodi dotati di un sottile esoscheletro molto permeabile all'aria e all'acqua e costituiscono una specie di Artropodi che differisce, per quanto concerne le vie e i tassi di esposizione, dai lombrichi e dagli Enchitreidi.
3. In molti ecosistemi terrestri la densità di popolazione dei Collemboli è generalmente dell'ordine di 10^5 m^{-2} nel suolo e negli strati di lettiera fogliare (3) (4). In genere gli adulti misurano da 0,5 a 5 mm e il loro contributo alla biomassa animale totale presente nel terreno e alla respirazione totale del suolo è modesto, stimato tra l'1 % e il 5 % (5). Il loro ruolo più importante può pertanto essere quello di regolatori potenziali dei processi ecologici attraverso la predazione di microorganismi e di microfauna. I Collemboli sono preda di una vasta gamma di invertebrati endogeici e epigeici, quali acari, millepiedi, ragni, carabidi e stafilinidi. I Collemboli contribuiscono al processo di decomposizione nei suoli acidi in cui possano costituire, assieme agli Enchitreidi, i principali invertebrati presenti, poiché i lombrichi e i diplopodi ne sono solitamente assenti.
4. La *Folsomia fimetaria* è diffusa su tutto il pianeta ed è comune in molti tipi di terreni, che vanno dai suoli sabbiosi a quelli limosi, fino a diverse forme di humus (da mull a mor). Si tratta di un Collembolo privo di occhi e pigmentazione che è stato osservato nei terreni agricoli di tutta Europa (6). Ha una dieta onnivora, che comprende ife fungine, batteri, protozoi e detriti. Attraverso il pascolo degli animali interagisce con infezioni causate da funghi fitopatogeni (7) e può esercitare un'influenza sulle micorrize, come è noto nel caso della *F. candida*. Come per la maggior parte delle specie di Collemboli, anche questa si riproduce sessualmente e la presenza permanente dei maschi è indispensabile ai fini della fecondazione delle uova.
5. Anche la *F. candida* è diffusa ovunque. Sebbene non sia comune nella maggior parte dei terreni naturali, si ritrova spesso in numerosi luoghi ricchi di humus. Si tratta di un Collembolo privo di occhi e pigmentazione. Dotato di una furca (organo di salto) ben sviluppata, corre rapidamente e spicca salti subitanei se disturbato. Il ruolo ecologico della *F. candida* è simile a quello della *F. fimetaria*, ma i suoi habitat sono costituiti da terreni organici ricchi. Si riproduce per partenogenesi. La percentuale di maschi può essere inferiore all'1 per mille.

PRINCIPIO DELLA PROVA

6. Gli esemplari sincronizzati di Collemboli adulti (*F. fimetaria*) o giovani (*F. candida*), sono esposti a un intervallo di concentrazioni della sostanza chimica in esame mescolata ad un terreno artificiale (8) con un contenuto di materia organica pari al 5 % (o a un terreno alternativo). Si possono distinguere due fasi nella procedura di prova:
 - una prova preliminare per definire le concentrazioni da utilizzare (*range-finding test*), se non sono disponibili sufficienti informazioni sulla tossicità, in cui la mortalità e la riproduzione sono i principali parametri, valutati dopo 2 settimane per la *F. fimetaria* e dopo 3 settimane per la *F. candida*;
 - una prova finale di riproduzione, nella quale si valuta il numero totale di esemplari giovani generati dai progenitori e la sopravvivenza di questi ultimi. La durata della prova è di 3 settimane per la *F. fimetaria* e di 4 settimane per la *F. candida*.

L'eventuale effetto tossico della sostanza chimica in esame sulla mortalità e sul tasso di riproduzione degli adulti è misurato dai valori espressi come LC_x e EC_x , eseguendo, per regressione non lineare, un aggiustamento dei dati a un modello adeguato allo scopo di calcolare la concentrazione che causerebbe $x\%$ di mortalità o di riduzione del tasso riproduttivo, rispettivamente, o in alternativa il valore NOEC/LOEC (9).

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA CHIMICA IN ESAME

7. È auspicabile conoscere le proprietà fisiche, la solubilità in acqua, il log Kow, il coefficiente di ripartizione tra l'acqua e il suolo e la pressione di vapore della sostanza chimica in esame. Sono utili informazioni supplementari sull'evoluzione della sostanza chimica in esame nel terreno, segnatamente la velocità di fotolisi, idrolisi e biodegradazione. Se tali informazioni sono disponibili, vanno registrati l'identificazione della sostanza chimica in esame secondo la nomenclatura IUPAC, il numero CAS, il lotto di fabbricazione, il lotto di confezionamento, la formula strutturale e il grado di purezza.
8. Il presente metodo di prova può essere utilizzato per sostanze chimiche idrosolubili o insolubili in acqua. Tuttavia, la modalità di applicazione della sostanza chimica in esame varierà di conseguenza. Questo metodo di prova non si applica alle sostanze volatili, vale a dire le sostanze la cui costante di Henry o il coefficiente di ripartizione acqua/aria sono superiori a 1, o le sostanze la cui pressione di vapore supera 0,0133 Pa a 25 °C.

VALIDITÀ DELLA PROVA

9. Il risultato della prova è considerato valido se i campioni di controllo non trattati soddisfano i seguenti criteri:
 - la mortalità media degli adulti non supera il 20 % al completamento della prova;
 - il numero medio di esemplari giovani per recipiente è pari almeno a 100 al completamento della prova;
 - il coefficiente di variazione calcolato per il numero di esemplari giovani non supera il 30 % al completamento della prova finale.

SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

10. Per verificare che la risposta degli organismi sperimentali nel sistema sperimentale rimanga entro il livello normale occorre testare periodicamente — o se possibile prima di ciascuna prova — la sostanza chimica di riferimento alla concentrazione EC₅₀ per il tipo di terreno scelto per la prova. Una sostanza di riferimento adeguata è l'acido borico, che dovrebbe ridurre del 50 % la riproduzione di entrambe le specie (10) (11) a circa 100 mg/kg di terreno in peso secco.

DESCRIZIONE DELLA PROVA

Recipienti e attrezzature di prova

11. Sono adeguati i recipienti di prova capaci di contenere 30 g di terreno umido. Possono essere di vetro o di plastica inerte (non tossica). Tuttavia, va evitato l'impiego di contenitori di plastica che, a causa di fenomeni di sorbimento, riducono l'esposizione alla sostanza chimica in esame. I recipienti di prova hanno una superficie orizzontale tale da poter contenere campioni di suolo di una profondità effettiva di 2-4 cm. I recipienti sono provvisti di coperchio (ad es. di vetro o di polietilene) che riducono l'evaporazione dell'acqua, ma permettano gli scambi gassosi fra suolo e atmosfera. I recipienti sono almeno parzialmente trasparenti per consentire il passaggio della luce.
12. Il metodo di prova richiede una normale apparecchiatura di laboratorio, in particolare:
 - camera di essiccazione;
 - stereomicroscopio;
 - pH-metro e luxmetro;
 - adeguate bilance di precisione;
 - adeguati strumenti di controllo della temperatura;
 - adeguati strumenti di controllo dell'umidità dell'aria (facoltativi se i recipienti sono dotati di coperchio);
 - incubatore o piccola camera a temperatura controllata;
 - pinzette o dispositivo di aspirazione dell'aria di bassa potenza.

Preparazione del terreno di prova

13. Per la prova si utilizza un terreno artificiale modificato (8) con un tenore di materia organica del 5 %. In alternativa può essere utilizzato un terreno naturale, se il terreno artificiale non somiglia a quello naturale. La composizione raccomandata del terreno artificiale è la seguente (in peso secco, essiccato a 105 °C fino a peso costante):
- 5 % di torba di sfagno, essiccata all'aria e finemente macinata (è accettabile una granulometria di 2 ± 1 mm);
 - 20 % di argilla caolinica (tenore di caolinite di preferenza superiore al 30 %);
 - 74 % ca. di sabbia industriale essiccata all'aria (a seconda della quantità di CaCO₃ necessaria), sabbia a grana prevalentemente fine con oltre il 50 % di particelle di granulometria compresa tra 50 e 200 micron. Il quantitativo esatto di sabbia dipende dalla quantità di CaCO₃ (cfr. *infra*): la quota combinata dei due componenti deve raggiungere il 75 %;
 - 1,0 % di carbonato di calcio (CaCO₃ in polvere, grado analitico) per ottenere un pH di 6,0 ± 0,5; la quantità di carbonato di calcio da aggiungere dipende soprattutto dalla qualità e dalla natura della torba (cfr. nota 1).

Nota 1: La quantità di CaCO₃ necessaria dipenderà dai componenti del substrato del terreno e deve essere determinata misurando, immediatamente prima della prova, il pH su sottocampioni di terreno umido pre-incubato.

Nota 2: Per consentire la normalizzazione in una fase successiva e una migliore interpretazione dei risultati, si raccomanda di misurare il pH e, su base facoltativa, il rapporto C/N, la capacità effettiva di scambio cationico (CESC), il tenore di materia organica del suolo.

Nota 3: Se necessario, ad esempio per specifiche finalità sperimentali, possono essere utilizzati come substrato di prova e/o di coltura terreni naturali provenienti da siti non inquinati. Tuttavia, quando si utilizza un terreno naturale, occorre caratterizzarlo almeno in base all'origine (sito di prelievo), pH, consistenza (distribuzione granulometrica), CESC e tenore di materia organica. Se disponibili, vanno indicati il tipo e la denominazione del terreno in base alla relativa classificazione e il terreno deve essere esente da contaminazioni. Per quanto riguarda i suoli naturali, è opportuno dimostrare che sono adatti alla prova e permettono di soddisfare i criteri di validità della stessa.

14. Mescolare accuratamente i componenti secchi del terreno (ad esempio in un grande miscelatore da laboratorio). Determinare la capacità massima di ritenzione idrica (WHC) del terreno artificiale conformemente ai protocolli descritti nell'appendice 5. Il tenore di umidità del terreno di prova va ottimizzato in modo da ottenere una struttura leggera e porosa che consenta ai Collemboli di penetrare nei pori, il che accade generalmente tra 40 e 60 % della capacità massima di ritenzione idrica.
15. Per equilibrare/stabilizzare l'acidità del terreno, da due a sette giorni prima dell'inizio della prova pre-inumidire il terreno artificiale secco aggiungendo una quantità sufficiente di acqua deionizzata fino ad ottenere circa la metà del tenore finale di umidità. Per determinare il pH si utilizza un miscuglio di terreno e una soluzione 1 M di cloruro di potassio (KCl) o una soluzione 0,01 M di cloruro di calcio (CaCl₂) in un rapporto 1:5 (come da appendice 6). Se l'acidità del suolo è superiore al limite richiesto, essa può essere corretta mediante un quantitativo adeguato di CaCO₃. Se il suolo è troppo alcalino, il pH può essere ridotto con l'aggiunta di un acido inorganico innocuo per i Collemboli.
16. Suddividere il suolo pre-inumidito in porzioni corrispondenti al numero delle concentrazioni di prova (e della sostanza di riferimento, se del caso) e dei campioni di controllo da utilizzare nella prova. Aggiungere le sostanze chimiche in esame e regolare il tenore d'acqua, come indicato al paragrafo 24.

Selezione e preparazione degli animali sperimentali

17. La *F. candida*, che si riproduce per partenogenesi, è la specie raccomandata perché nelle prove interlaboratorio volte a testare il presente metodo di prova (11), questa specie ha soddisfatto il criterio di validità relativo alla sopravvivenza più spesso rispetto alla *F. fimetaria*. Se si fa ricorso a una specie alternativa, è necessario verificare che essa si conformi ai criteri di validità di cui al paragrafo 9. All'inizio della prova gli animali devono aver ricevuto un corretto apporto di cibo ed essere di età compresa tra 23 e 26 giorni nel caso di *F. fimetaria* e tra 9 e 12 giorni in quello di *F. candida*. Per ciascuna replica, il numero di *F. fimetaria* è di 10 maschi e 10 femmine, mentre per *F. candida* vanno utilizzate 10 femmine (cfr. appendici 2 e 3). Per ciascuno dei lotti aggiunti ad una replica, gli animali sincroni sono scelti in modo casuale dai contenitori e occorre controllarne lo stato di salute e la condizione fisica. Ciascun gruppo di 10/20 individui è aggiunto ad un recipiente di prova scelto in modo casuale, scegliendo femmine grandi di *F. fimetaria* in modo che possano distinguersi facilmente dai maschi della stessa specie.

Preparazione delle concentrazioni sperimentali

18. Quattro metodi di applicazione della sostanza chimica in esame possono essere utilizzati: 1) mescolare la sostanza chimica in esame con il campione di suolo utilizzando l'acqua come vettore, 2) mescolare la sostanza chimica in esame con il campione di suolo utilizzando un solvente organico come vettore; 3) mescolare la sostanza chimica in esame con il campione di suolo utilizzando sabbia come vettore; oppure 4) applicare la sostanza chimica in esame sulla superficie del suolo. La scelta del metodo appropriato dipende dalle caratteristiche della sostanza chimica in esame e dalla finalità della prova. Si raccomanda, in generale, di mescolare la sostanza chimica in esame con il suolo. Tuttavia potrebbero essere necessarie modalità di applicazione conformi all'uso concreto della sostanza chimica in esame (ad esempio, irrorazione di preparati liquidi o l'uso di speciali preparati di pesticidi ad es. in granuli o prodotti per il trattamento delle sementi). Il terreno va trattato prima dell'aggiunta dei Collemboli, che occorre lasciar penetrare nel suolo, salvo quando la sostanza chimica in esame venga applicata sulla superficie.

Sostanza chimica idrosolubile

19. Preparare una soluzione della sostanza chimica in esame in acqua deionizzata in quantità sufficiente per tutte le repliche della stessa concentrazione sperimentale. Mescolare ciascuna soluzione della sostanza chimica in esame con un lotto di terreno prenumidito, prima di inserirla nel recipiente di prova.

Sostanza chimica insolubile in acqua

20. Le sostanze chimiche non solubili in acqua, ma solubili nei solventi organici, possono essere sciolte nel minor volume possibile di un solvente appropriato (ad esempio acetone), avendo comunque cura di mescolare adeguatamente la sostanza chimica nel terreno e di mescolare il tutto con la necessaria proporzione di sabbia di quarzo. Soltanto i solventi volatili possono essere utilizzati. Se viene utilizzato un solvente organico, tutte le concentrazioni di prova e un controllo negativo di solvente supplementare devono contenere la stessa quantità minima di solvente. I recipienti in cui è effettuata l'applicazione sono lasciati senza coperchio per un certo periodo di tempo al fine di consentire al solvente associato all'applicazione della sostanza chimica in esame di evaporare, assicurando che non si verifichi alcuna fuga della sostanza chimica tossica durante tale periodo.

Sostanza chimica poco solubile in acqua e nei solventi organici

21. Per le sostanze chimiche poco solubili in acqua e nei solventi organici, mescolare sabbia di quarzo — che deve rientrare nella quantità totale di sabbia aggiunta al suolo — alla quantità di sostanza chimica in esame per ottenere la concentrazione sperimentale voluta. Questa miscela di sabbia di quarzo e sostanza chimica in esame è incorporata al terreno prenumidito, mescolando a fondo dopo l'aggiunta della quantità necessaria di acqua deionizzata per raggiungere il grado di umidità richiesto. La miscela finale è distribuita nei recipienti di prova. La procedura è ripetuta per ciascuna concentrazione sperimentale, preparando anche un idoneo controllo.

Applicazione della sostanza chimica in esame sulla superficie del suolo

22. Se la sostanza chimica in esame è un pesticida può essere opportuno applicarlo alla superficie del suolo mediante nebulizzazione, trattando il terreno dopo l'aggiunta dei Collemboli. Anzitutto, riempire i recipienti di prova con il substrato di suolo umido, aggiungere gli animali e pesare i recipienti. Al fine di evitare l'esposizione diretta degli animali a contatto diretto con la sostanza chimica in esame, questa è applicata almeno mezz'ora dopo l'introduzione dei Collemboli. La sostanza chimica in esame deve essere ripartita sulla superficie del suolo nel modo più regolare possibile, utilizzando un adeguato spruzzatore da laboratorio per simulare l'applicazione sul campo. L'applicazione va effettuata ad una temperatura entro ± 2 °C di variazione e, nel caso di soluzioni acquose, emulsioni o dispersioni a un tasso di applicazione idrica conforme alle raccomandazioni di valutazione dei rischi. Occorre verificare il tasso utilizzando una tecnica di taratura appropriata. L'applicazione di composizioni speciali, come i granuli o i prodotti per il trattamento delle sementi, può avvenire conformemente all'uso in agricoltura. Il cibo è aggiunto dopo la nebulizzazione.

PROCEDURA

Condizioni sperimentali

23. La prova è eseguita a una temperatura di 20 ± 1 °C, in un intervallo di temperatura di 20 ± 2 °C. La prova viene eseguita con cicli controllati di luce/buio (preferibilmente 12 ore di luce e 12 ore di buio), con un illuminamento di 400-800 lux nella zona dei recipienti di prova.

24. Per verificare l'umidità del terreno si pesano i recipienti all'inizio, a metà e al termine della prova. Qualsiasi perdita di peso > 2 % è compensata aggiungendo acqua deionizzata. Si noti che la perdita d'acqua può essere ridotta mantenendo un tasso di umidità dell'aria elevato (> 80 %) nell'incubatrice.
25. Il pH viene misurato all'inizio e alla fine sia della prova preliminare di determinazione delle concentrazioni sia della prova finale. Le misurazioni devono essere effettuate su un campione supplementare di controllo e un campione supplementare di terreno trattato (a tutte le concentrazioni), preparati e conservati allo stesso modo delle colture sperimentali, ma senza aggiunta dei Collemboli.

Procedura e prescrizioni di prova.

26. Per ciascuna concentrazione di prova, una quantità di terreno di prova corrispondente a 30 g di peso fresco è inserita all'interno del recipiente di prova. Vanno preparati dei controlli d'acqua, senza la sostanza chimica in esame. Se la sostanza chimica in esame è applicata con un mezzo disperdente, una serie di controlli contenente soltanto il mezzo disperdente va eseguita in aggiunta alla serie trattata con la sostanza chimica in esame. La concentrazione dell'eventuale solvente o disperdente deve essere identica a quella usata nei recipienti contenenti la sostanza chimica in esame.
27. I Collemboli sono trasferiti con cura nei diversi recipienti di prova (nei quali sono distribuiti a caso) e posti sulla superficie del suolo. Per garantire un adeguato trasferimento degli animali, può essere utilizzato un dispositivo di aspirazione a bassa potenza. Il numero di repliche per le concentrazioni sperimentali e dei controlli dipende dal disegno sperimentale. I contenitori di prova sono posizionati a caso nell'incubatrice e la loro posizione è modificata a caso ogni settimana.
28. Per i test con *F. fimetaria*, 20 adulti, 10 maschi e 10 femmine, di età compresa tra 23 e 26 giorni sono utilizzati per recipiente di prova. Il 21° giorno, i Collemboli sono estratti dal suolo e contati. Nel caso di *F. fimetaria*, il sesso degli animali sincronizzati che compongono il lotto utilizzato per la prova è determinato in base alle loro dimensioni. Le femmine sono nettamente più grandi dei maschi (cfr. appendice 3).
29. Per i test con *F. candida*, sono utilizzati 10 giovani di 9-12 giorni per ogni recipiente. Il 28° giorno, i Collemboli sono estratti dal suolo e contati.
30. Aggiungere una fonte di cibo adeguata costituita da una quantità sufficiente, ad esempio, 2-10 mg di lievito per panificazione secco in granuli, disponibile in commercio per uso domestico, a ciascun recipiente all'inizio della prova e dopo 2 settimane circa.
31. Valutare, all'inizio della prova, la mortalità e il tasso riproduttivo. Dopo 3 settimane (*F. fimetaria*) o 4 settimane (*F. candida*), estrarre i Collemboli dai campioni di suolo (cfr. appendice 4) e contarli (12). I Collemboli che non sono presenti all'estrazione sono registrati come morti. Il metodo di estrazione e di conteggio vanno validati. La validazione include l'efficacia dell'estrazione degli esemplari giovani maggiore di 95 %, ad esempio aggiungendo un numero conosciuto al terreno.
32. Lo svolgimento concreto della procedura di prova e il relativo calendario sono descritti nell'appendice 2.

Disegno sperimentale

Test di definizione dell'intervallo di concentrazioni

33. Se del caso, va svolto un test per determinare l'intervallo delle concentrazioni da usare che verta, ad esempio, su cinque concentrazioni sperimentali: 0,1, 1,0, 10, 100 e 1 000 mg/kg di massa secca di terreno. Sono preparate anche due repliche per ciascuna concentrazione e per il campione di controllo. Ulteriori informazioni, derivanti da prove con sostanze chimiche simili o tratte dalla letteratura specializzata, sulla mortalità o sulla riproduzione dei Collemboli possono anche essere utili per decidere l'intervallo di concentrazioni da sottoporre al test di determinazione degli intervalli delle concentrazioni.
34. La durata del test di definizione dell'intervallo delle concentrazioni è di due settimane per *F. fimetaria* e 3 settimane per *F. candida* al fine di garantire la disponibilità di esemplari giovani. Alla fine della prova, sono valutate la mortalità e la riproduzione dei Collemboli. Vanno registrati il numero degli adulti e quello dei giovani esemplari.

Prova principale

35. Per determinare la EC_x (per esempio EC_{10} , EC_{50}) è necessario testare 12 concentrazioni. Si raccomanda di preparare almeno due repliche per concentrazione di prova più 6 controlli identici. Il fattore di distanza può variare in funzione della relazione dose-risposta.
36. Per determinare la NOEC/LOEC, occorre testare almeno cinque concentrazioni in serie geometrica. Si raccomanda di includere quattro repliche per ciascuna concentrazione di prova più 8 controlli. Le concentrazioni devono essere distanziate da un fattore non superiore a 1,8.
37. Un approccio combinato permette di determinare la NOEC/LOEC e la EC_x . A tale scopo si usano 8 concentrazioni in serie geometrica. Si raccomanda di includere quattro repliche per ciascuna concentrazione di prova più 8 controlli. Le concentrazioni devono essere distanziate da un fattore non superiore a 1,8.
38. Se non si osserva alcun effetto alla concentrazione massima individuata durante il test di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni (1 000 mg/kg), la prova sulla riproduzione può essere eseguita come prova limite, con una concentrazione sperimentale di 1 000 mg/kg e con un campione di controllo. Una prova limite consentirà di dimostrare l'assenza di effetto statisticamente significativo alla concentrazione limite. Vanno utilizzate 8 repliche sia per il suolo trattato sia per il controllo.

DATI E RELAZIONE**Trattamento dei risultati**

39. Il principale parametro da valutare (endpoint) è il tasso di riproduzione (ad esempio il numero di esemplari giovani generati per recipiente di prova). L'analisi statistica, ad esempio mediante le procedure ANOVA, confronta le diverse concentrazioni mediante il test t di Student, il test di Dunnett o il test di Williams. Gli intervalli di confidenza al 95 % sono calcolati per le medie di ciascuna concentrazione.
40. Il numero di adulti sopravvissuti nei controlli non trattati è un criterio di validità fondamentale che deve essere documentato. Come nel test di definizione dell'intervallo delle concentrazioni, anche tutti gli altri segni di nocività vanno riportati nella relazione finale.

 LC_x e EC_x

41. Calcolare i valori EC_x e i relativi limiti di confidenza al 95 % superiori e inferiori per il parametro, utilizzando metodi statistici appropriati (funzione logistica o di Weibull, metodo semplificato di Spearman-Karber o semplice interpolazione). Si ottiene un valore EC_x inserendo un valore pari a $x\%$ della media dei controlli nell'equazione risultante. Per calcolare la EC_{50} o qualsiasi altra EC_x occorre sottoporre la serie completa di dati a un'analisi di regressione. La LC_{50} viene generalmente stimata mediante analisi Probit o analisi analoga che tenga conto dei dati sulla mortalità con distribuzione binomiale.

NOEC/LOEC

42. Se si applica un'analisi statistica per determinare la NOEC/LOEC, è necessario disporre di statistiche per recipiente (ogni singolo recipiente è considerato una replica). Occorre quindi utilizzare metodi statistici adeguati, conformemente al documento n. 54 dell'OCSE Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity data: A Guidance to Application (9). In generale, gli effetti nocivi della sostanza chimica in esame rispetto al controllo sono analizzati applicando un'ipotesi unilaterale con un'analisi a $p \leq 0,05$.
43. La distribuzione normale dei dati e l'omogeneità della varianza possono essere analizzate, ad esempio, rispettivamente mediante il test di Shapiro-Wilk o il test di Levene ($p \leq 0,05$). Possono essere applicati un'analisi della varianza ANOVA a un fattore e successivi test per confronti multipli. I confronti multipli (ad esempio, test t di Dunnett) o i test di tendenza regressiva (ad esempio, test di Williams) possono essere utilizzati ai fini del calcolo di eventuali differenze significative ($p \leq 0,05$) tra i controlli e le varie concentrazioni della sostanza chimica in esame [(per scegliere la prova raccomandata si consulti il documento n. 54 dell'OCSE (9)]. Si possono tuttavia utilizzare metodi non parametrici (test U di Bonferroni secondo il test di tendenza di Holm o di Jonckheere-Terpstra) per determinare la LOEC e la NOEC.

Prova limite

44. Se è stata eseguita una prova limite (confronto tra il controllo e un unico trattamento) e se sono rispettati i presupposti necessari per le procedure delle prove parametriche (normalità, omogeneità), è possibile valutare le risposte metriche mediante il test di Student (t-test).
45. Per determinare significative differenze tra i controlli (campione di controllo e controllo con solvente), le repliche di ciascun controllo possono essere testate come descritto per la prova limite. Se le prove non rivelano alcuna differenza significativa, è possibile raggruppare assieme tutte le repliche del gruppo di controllo e del gruppo di controllo con solvente. In caso contrario, occorre confrontare tutti i livelli di esposizione con il gruppo di controllo con solvente.

Relazione sulla prova

46. La relazione sulla prova deve quantomeno includere le seguenti informazioni:

Sostanza chimica in esame

- Identità della sostanza chimica in esame, denominazione, partita, lotto e numero CAS, purezza;
- proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica in esame (ad esempio log Kow, solubilità in acqua, pressione di vapore, costante di Henry (H) e, di preferenza, informazioni sull'evoluzione della sostanza chimica in esame nel terreno);
- se la sostanza chimica in esame non è utilizzata nella sua forma pura, ne vanno specificati la formulazione e la natura degli additivi.

Organismi sperimentali

- Identificazione della specie e del fornitore degli organismi sperimentali, descrizione delle condizioni culturali e fascia d'età degli organismi sperimentali.

Condizioni sperimentali

- Descrizione del disegno sperimentale e della procedura;
- informazioni dettagliate sulla preparazione del terreno di prova; descrizione dettagliata se si utilizza un terreno naturale (origine, storia, distribuzione granulometrica, pH, tenore di materie organiche);
- capacità massima di ritenzione idrica del terreno;
- descrizione della tecnica utilizzata per somministrare la sostanza chimica in esame nel terreno;
- condizioni sperimentali: intensità luminosa, durata dei cicli luce/buio, temperatura;
- descrizione del regime di alimentazione, tipo e quantità di cibo fornito durante la prova, date di alimentazione;
- pH e tenore di umidità del terreno all'inizio e durante la prova (controllo e ciascun trattamento);
- descrizione dettagliata del metodo di estrazione e dell'efficienza di estrazione.

Risultati della prova

- Numero di esemplari giovani determinato in ciascun recipiente di prova al completamento della prova;
- numero di adulti e relativa mortalità (%) in ciascun recipiente di prova al completamento della prova;
- descrizione di evidenti sintomi fisiologici o patologici o modifiche evidenti di comportamento;
- risultati ottenuti con la sostanza chimica di riferimento in esame;
- valori della NOEC/LOEC, LC_x per la mortalità e EC_x per la riproduzione (principalmente le LC₅₀, LC₁₀, EC₅₀ e EC₁₀) e relativi intervalli di confidenza al 95 %. Un grafico del modello adattato utilizzato per effettuare il calcolo, la relativa equazione della funzione specifica e i relativi parametri (9);

- tutte le informazioni e osservazioni che possono essere utili per interpretare i risultati delle prove;
- potenza del test effettivamente realizzato se si procede a una verifica dell'ipotesi formulata (9);
- deviazioni rispetto alle procedure descritte nel presente metodo di prova e eventuali fatti insoliti verificatisi nel corso della prova;
- validità della prova;
- in caso di stima della NOEC, differenza minima rilevabile.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Wiles JA and Krogh PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (ed. H Løkke and CAM Van Gestel), pp. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester
- 2) ISO (1999) Soil Quality — Effects of soil pollutants on Collembola (*Folsomia candida*): Method for determination of effects on reproduction. No. 11267. International Organization for Standardization, Geneve.
- 3) Burges A and Raw F (Eds) (1967) Soil Biology. Academic Press. London
- 4) Petersen H and Luxton M (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388
- 5) Petersen H (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. Acta Zoologica Fennica 195: 111-118
- 6) Hopkin SP (1997). Biology of the Springtails (Insecta: Collembola). Oxford University Press. 330 pp ISBN 0-19-854084-1
- 7) Ulber B (1983) Einfluss von Onychiurus fimatus Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (Eds), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-Neuve (Belgium), 30 August-2 September 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, pp. 261-268
- 8) Chapter C.36 of this Annex, Predatory mite (*Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer*) reproduction test in soil.
- 9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.
- 10) Scott-Fordsmand JJ and Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project, No. 986. Miljøstyrelsen 61 pp. Danish Ministry for the Environment.
- 11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish Environmental Protection Agency, Environmental aspects of PVC, 1996.
- 12) Krogh PH, Johansen K and Holmstrup M (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. Appl. Soil Ecol. 7, 201-205
- 13) Fjellberg A (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.
- 14) Edwards C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In Soil Zoology (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, London, pp. 412-416
- 15) Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a note on the use of a fungistatic substance in the cultures. Entomologists' Monthly Magazine 96:138-140.

Appendice 1

Definizioni

Le seguenti definizioni si applicano ai fini del presente metodo di prova (nella presente prova tutte le concentrazioni che determinano un effetto sono espresse come massa della sostanza chimica in esame in rapporto alla massa secca del terreno di prova):

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

NOEC (No Observed Effect Concentration — concentrazione senza effetti osservabili): la concentrazione della sostanza chimica in esame alla quale non si osserva alcun effetto. Nella fattispecie, la concentrazione che corrisponde alla NOEC non ha alcun effetto statisticamente significativo ($p < 0,05$) rispetto al controllo in un determinato periodo di esposizione.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration — Concentrazione minima a cui si osserva un effetto statisticamente significativo): la concentrazione della sostanza chimica in esame più bassa che produce un effetto statisticamente significativo ($p < 0,05$) rispetto al controllo in un determinato periodo di esposizione.

EC_x (concentrazione efficace all'x %): la concentrazione che determina un effetto pari all'x % sugli organismi sperimentali in un determinato periodo di esposizione rispetto al controllo. Ad esempio, EC₅₀ è una concentrazione che si ritiene produca un effetto su un parametro sottoposto a valutazione nel 50 % della popolazione esposta nel corso di un determinato periodo di esposizione.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata in applicazione del presente metodo di prova.

Appendice 2

Principali azioni e calendario della prova sui collemboli

Le fasi della prova possono essere riassunte come segue:

Tempo (giorno)	Azione
- 23 a - 26	Preparazione di una coltura sincronizzata di <i>F. fimetaria</i>
-14	Preparazione del terreno artificiale (mescolare i componenti secchi) Controllo del pH del terreno artificiale e eventuale necessario adeguamento Misurazione della capacità massima di ritenzione idrica del suolo
- 9 a - 12	Preparazione di una coltura sincronizzata di <i>F. candida</i>
- 2 a - 7	Pre-inumidimento del suolo
- 1	Ripartizione in lotti degli esemplari giovani Preparazione delle soluzioni madre e applicazione della sostanza chimica in esame se è richiesto un solvente
0	Preparazione delle soluzioni madre e applicazione della sostanza chimica in esame, se si tratta dell'applicazione di una sostanza solida, idrosolubile o se è richiesta un'applicazione sulla superficie del terreno. Misurazione del pH del terreno e pesatura dei contenitori Apporto di cibo. Introduzione dei Collemboli
14	Test di <i>range-finding</i> per <i>F. fimetaria</i> : termine del test, estrazione degli animali, misurazione del pH del terreno e della perdita d'acqua (peso) Prova finale: misurazione del tenore di umidità, riempimento dell'acqua e aggiunta da 2 a 10 mg di lievito
21	Prova finale per <i>F. fimetaria</i> : termine del test, estrazione degli animali, misurazione del pH del terreno e della perdita d'acqua (peso) Test di <i>range-finding</i> per <i>F. candida</i> : termine del test, estrazione degli animali, misurazione del pH del terreno e della perdita d'acqua (peso)
28	Prova finale per <i>F. candida</i> : termine del test, estrazione degli animali, misurazione del pH del terreno e della perdita d'acqua (peso)

Appendice 3

Orientamenti in materia di coltura delle specie *F. fimetaria* e *F. candida*

Le indicazioni temporali proposte nei presenti orientamenti vanno verificate per ogni specifico ceppo di Collemboli in modo da garantire che ci sia il tempo necessario per generare una quantità sufficiente di esemplari giovani sincronizzati. Fondamentalmente, è il verificarsi della ovideposizione dopo il trasferimento degli adulti ad un substrato fresco e della schiusa delle uova che determina il giorno idoneo per la raccolta delle uova e degli esemplari giovani sincronizzati.

Si raccomanda di disporre in permanenza di una coltura madre composta, ad esempio, da 50 contenitori/piastre Petri. La coltura madre deve essere mantenuta in buone condizioni di alimentazione fornendo cibo e acqua tutte le settimane, e rimuovendo il cibo vecchio e le carcasse. Una presenza troppo bassa di Collemboli nel substrato può comportare un'inibizione a causa di una maggiore proliferazione di muffe. Se utilizzata troppo spesso per la produzione di uova, la coltura madre rischia di esaurirsi. Costituiscono segnali di esaurimento la presenza di adulti morti e di muffe sul substrato. Le uova rimanenti dalla produzione di animali sincroni possono servire per ringiovanire la coltura.

In una coltura sincronizzata di *F. fimetaria*, i maschi si distinguono dalle femmine soprattutto per la dimensione. I maschi sono nettamente più piccoli delle femmine e si spostano più velocemente. Non è richiesta grande esperienza per determinare correttamente i sessi, che possono essere confermati mediante ispezione della zona genitale al microscopico (13).

1. Cultura

1.a. Preparazione del substrato di coltura

Il substrato culturale è costituito da gesso di Parigi (solfato di calcio) e carbone attivo. Si ottiene così un substrato umido, in cui il carbone serve ad assorbire gli escrementi e i gas generati (14) (15). Varie forme di carbone possono essere utilizzate per facilitare l'osservazione dei Collemboli. Ad esempio, il carbone di legna in polvere è utilizzato per le specie *F. candida* e *F. fimetaria* (e conferisce una colorazione grigio-nera al gesso di Parigi):

Composizione del substrato:

- 20 ml di carbone attivo
- 200 ml di acqua distillata
- 200 ml di gesso di Parigi

oppure

- 50 g di carbone attivo, in polvere
- 260-300 ml di acqua distillata
- 400 g di gesso di Parigi.

Lasciare riposare la miscela del substrato prima dell'uso.

1.b. Riproduzione

I Collemboli sono conservati in contenitori, quali le piastre Petri (90 mm × 13 mm), il cui fondo è ricoperto di uno strato di 0,5 cm di substrato composto di gesso e carbone di legna. Sono coltivati ad una temperatura di 20 ± 1 °C e con un ciclo di 12 ore di luce e 12 ore di oscurità (400-800 lux). I contenitori sono tenuti costantemente umidi in modo che l'umidità relativa dell'aria all'interno rimanga del 100 %. Tale condizione può essere raggiunta assicurando la presenza di acqua nel gesso poroso, evitando tuttavia che si formi uno strato d'acqua sulla superficie del gesso. La perdita d'acqua può essere evitata mantenendo umida l'aria ambiente. Vanno rimossi eventuali esemplari morti e residui ammuffiti di cibo. Per stimolare la produzione di uova, gli animali adulti vanno trasferiti in piastre Petri con un substrato fresco di gesso di Parigi e carbone di legna.

1.c. Fonti di cibo

L'unica fonte di cibo utilizzata per le specie *F. fimetaria* e *F. candida* è il lievito per panificazione secco in granuli. Cibo fresco è somministrato una o due volte a settimana, per evitare che ammuffisca. Il cibo è posto direttamente sul gesso di Parigi in un piccolo cumulo. La quantità di lievito per panificazione aggiunto dovrebbe essere adattata alle dimensioni della popolazione di Collemboli, ma una quantità di 2-15 mg è generalmente sufficiente.

2. Sincronizzazione

La prova viene eseguita con animali sincronizzati per disporre di animali sperimentali omogenei, nello stesso stadio di sviluppo e della stessa dimensione. Inoltre, la sincronizzazione permette di distinguere gli *F. fimetaria* maschi dalle femmine a partire dall'età di 3 settimane sulla base del loro dimorfismo sessuale, che si riflette nella differenza di dimensioni. Di seguito si propone un procedimento per ottenere animali sincronizzati (le tappe concrete sono facoltative).

2.a. Sincronizzazione.

- Preparare dei recipienti con uno strato di 0,5 cm di substrato composto di gesso di Parigi e di carbone di legna.
- Per l'ovideposizione, trasferire nei recipienti 150-200 adulti di *F. fimetaria* e 50-100 adulti di *F. candida* tratti dai 15-20 migliori recipienti di coltura madre con un substrato vecchio di 4-8 settimane; alimentarli con 15 mg di lievito per panificazione. Evitare la commistione di esemplari giovani con gli adulti, poiché la presenza dei primi rischia di inibire la produzione di uova.
- Mantenere la coltura a $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (la media deve essere di 20°C) in un ciclo di 12 ore di luce e 12 ore di oscurità (400-800 lux). Assicurare che sia disponibile cibo fresco e che l'aria sia satura d'acqua. La mancanza di alimentazione può indurre gli animali a defecare sulle uova, con la conseguente formazione di muffa sulle stesse, oppure gli esemplari di *F. candida* potrebbero cannibalizzare le proprie uova. Dopo 10 giorni le uova devono essere accuratamente raccolte con un ago e una paletta e depositate su piccoli pezzi di carta da filtro imbevuti di un impasto liquido di gesso di Parigi e di carbone di legna, collocati in un recipiente contenente substrato fresco costituito da gesso e carbone di legna. Qualche granello di lievito è aggiunto al substrato per attirare gli esemplari giovani e indurli a lasciare il supporto cartaceo. È importante che tanto la carta che il substrato siano umidi, perché altrimenti le uova si disidratano. Un'alternativa consiste nel rimuovere gli animali adulti dalle piastre di coltura sincronizzata dopo che hanno prodotto uova per 2 o 3 giorni.
- Dopo tre giorni, la maggior parte delle uova depositate sul supporto cartaceo si saranno schiuse ed alcuni esemplari giovani potrebbero trovarsi al di sotto del supporto.
- Per ottenere ulteriori esemplari giovani di età omogenea, il supporto cartaceo con le uova non schiuse presenti sono rimossi dalla piastra di Petri mediante una pinzetta. Gli esemplari giovani, che hanno un'età di 0-3 giorni, rimangono nella piastra e sono nutriti con lievito per panificazione. Le uova non schiuse vengono eliminate.
- Le uova e gli esemplari giovani che ne sono nati sono coltivati allo stesso modo degli adulti. In particolare, per *F. fimetaria* vanno rispettate le seguenti disposizioni: assicurare sufficiente cibo fresco ed eliminare il cibo ammuffito; dopo una settimana, gli esemplari giovani sono ripartiti in nuove piastre di Petri purché la densità rimanga superiore a 200.

2.b. Manipolazione dei Collemboli all'inizio della prova

- Raccogliere gli esemplari di 9-12 giorni di *F. candida* o di 23-26 giorni di *F. fimetaria*, ad esempio mediante aspirazione, e successivamente rilasciarli in un recipiente piccolo contenente un substrato umido costituito di gesso e carbone di legna; controllarne la condizione fisica con lo stereomicroscopio (gli animali feriti o danneggiati sono eliminati). Occorre seguire le varie tappe mantenendo i Collemboli in ambiente umido per evitare stress dovuto alla siccità, utilizzando ad esempio superfici inumidite, ecc.
- Rovesciare il recipiente e picchiettare in modo da trasferire i Collemboli sul suolo. Occorre neutralizzare l'elettricità statica, altrimenti gli animali rischiano di trovarsi in sospensione nell'aria o di aderire alle pareti del recipiente di prova, dove seccherebbero. A tal fine possono essere utilizzati uno ionizzatore o un pezzo di tessuto umido sotto il recipiente.
- Il cibo deve essere ripartito su tutta la superficie del terreno e non disposto in un unico cumulo.

- Durante il trasporto e durante il periodo di prova, è opportuno evitare di picchiettare o disturbare fisicamente in qualunque altro modo i recipienti di prova, poiché ciò rischia di accrescere la compattazione del suolo e compromettere l'interazione tra Collemboli.

3. Specie alternative di Collemboli

Altre specie di Collemboli possono essere selezionate per eseguire la sperimentazione con il presente metodo di prova, ad esempio *Proisotoma minuta*, *Isotoma viridis*, *Isotoma anglicana*, *Orchesella cincta*, *Sinella curviseta*, *Paronychiurus kimi*, *Orthonychiurus folsomi*, *Mesaphorura macrochaeta*. Alcune condizioni preliminari devono tuttavia essere soddisfatte prima di utilizzare tali altre specie:

- le specie devono essere chiaramente identificate;
 - la scelta della specie deve essere motivata;
 - occorre garantire che la biologia riproduttiva sia inclusa nella fase di prova, di modo che possa essere un obiettivo potenziale nel corso dell'esposizione;
 - si deve conoscerne il ciclo di vita: età di maturazione, periodo di sviluppo delle uova, stadi di sviluppo potenzialmente soggetti all'esposizione;
 - il substrato di prova e la disponibilità di cibo devono assicurare condizioni ottimali di crescita e di riproduzione;
 - la variabilità deve essere sufficientemente bassa da permettere una stima accurata e precisa della tossicità.
-

Appendice 4

Estrazione e conteggio degli animali

1. Sono disponibili due metodi di estrazione

- 1.a. Primo metodo: utilizzare un estrattore con gradiente di temperatura controllato, basato sui principi enunciati da MacFadyen (1). Il calore proveniente dall'elemento termico situato sulla parte superiore della scatola di estrazione è regolato da un termistore posto sulla superficie del campione di suolo. La temperatura del liquido refrigerato attorno al recipiente di raccolta è regolata da un termistore posto sulla superficie della scatola di raccolta (sotto il campione di suolo). I termistori sono collegati ad un'unità di controllo programmabile che aumenta la temperatura in base a uno schema prestabilito. Gli animali sono raccolti nella scatola di raccolta refrigerata (2 °C) la cui parte inferiore contiene uno strato di gesso di Parigi e di carbone di legna. L'estrazione inizia a 25 °C e la temperatura viene poi automaticamente aumentata di 5 °C ogni 12 ore per una durata complessiva di 48 ore. Dopo 12 ore a 40 °C l'estrazione è conclusa.
- 1.b. Secondo metodo: al termine del periodo di incubazione sperimentale, valutare con il metodo della flottazione il numero di esemplari giovani di Collemboli presenti. A tale scopo, la prova va eseguita in recipienti di volume di circa 250 ml. Al completamento della prova aggiungere circa 200 ml d'acqua distillata. Mescolare delicatamente il terreno con un pennello fine per permettere ai Collemboli di risalire verso la superficie dell'acqua. Per facilitare il conteggio, aumentando il contrasto tra l'acqua e i Collemboli bianchi, può essere aggiunta all'acqua una piccola quantità, circa 0,5 ml, di colorante fotografico nero Kentmere. Tale colorante non è tossico per i Collemboli.

2. Conteggio

Il conteggio degli animali può essere effettuato ad occhio nudo o con un microscopio ottico dopo aver inserito una griglia sul recipiente di flottazione, o ancora fotografando la superficie di ciascun recipiente e contando successivamente i Collemboli su ingrandimenti o su proiezioni di diapositive. Il conteggio può essere realizzato anche mediante tecniche di trattamento digitale delle immagini (12). La tecnica utilizzata deve essere stata validata.

Appendice 5

Determinazione della capacità massima di ritenzione idrica del terreno

Il seguente metodo per determinare la capacità massima di ritenzione idrica del terreno è considerato adeguato. Esso è descritto nell'allegato C della norma ISO DIS 11268-2 [Qualità del terreno — effetti degli inquinanti sui lombrichi (*Eisenia fetida*). Parte 2: Determinazione degli effetti sulla riproduzione (23)].

Prelevare una determinata quantità (ad es. 5 g) del substrato del terreno di prova mediante apposito strumento di campionamento (tubo Auger, ecc.). Coprire il fondo del tubo con un pezzo di carta da filtro imbevuta di acqua, e quindi disporlo su un supporto immerso nell'acqua. Il tubo deve essere progressivamente immerso fino a che il livello dell'acqua supera quello del terreno. Lasciare il tubo in acqua per circa tre ore. Poiché non tutta l'acqua assorbita dai capillari del terreno può essere ritenuta, il campione di terreno deve essere lasciato a drenare per 2 ore collocando il tubo sopra un letto di sabbia di quarzo fine molto umida posto in un recipiente chiuso (per evitare l'essiccamiento). Registrare il peso del campione e lasciarlo asciugare ad una temperatura di 105 °C fino al raggiungimento di una massa costante. La capacità di ritenzione idrica (WHC) viene quindi calcolata come segue:

$$\text{WHC} \text{ (in \% della massa secca)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

dove:

S = massa del substrato saturato in acqua + massa del tubo + massa della carta da filtro

T = tara (massa del tubo + massa della carta da filtro)

D = massa secca del substrato

*Appendice 6***Determinazione del pH del terreno**

Il seguente metodo per determinare il pH del terreno si basa sulla norma ISO 10390: Qualità del terreno — Determinazione del pH (16).

Lasciare asciugare un determinato quantitativo di terreno a temperatura ambiente per almeno 12 ore. Preparare una sospensione del terreno (contenente almeno 5 g di terreno) in cinque volte il suo volume di una soluzione 1 M di cloruro di potassio (KCl) di grado analitico o di una soluzione 0,01 M di cloruro di calcio (CaCl₂) di grado analitico. Agitare vigorosamente la sospensione per cinque minuti e lasciarla depositare per almeno due ore ma non oltre 24 ore. Misurare il pH della fase liquida con un pH-metro, calibrato prima di ciascuna misurazione utilizzando una serie adeguata di soluzioni tampone (pH 4,0 e 7,0, ad esempio).

C.40. PROVA DI TOSSICITÀ SUL CICLO DI VITA DEI CHIRONOMIDI IN ACQUA-SEDIMENTO CON ACQUA ADDIZIONATA O SEDIMENTO ADDIZIONATO

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 233 (2010) ed è inteso a valutare gli effetti dell'esposizione a sostanze chimiche su tutto il ciclo di vita del *Chironomus* sp., un dittero che vive nelle acque dolci, coprendo l'intera vita della prima generazione (generazione P) e la prima parte della vita della seconda generazione (generazione F1). Si tratta di un'estensione dei metodi di prova esistenti descritti nel capitolo C.28 (1) o C.27 (15), in cui l'esposizione avviene rispettivamente tramite acqua addizionata o tramite sedimento addizionato. Tiene conto dei protocolli esistenti per le prove di tossicità su *Chironomus riparius* e *Chironomus dilutus* (in precedenza denominato *C. tentans* (2)) messi a punto in Europa e in Nord America (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) e in seguito sottoposti a prove interlaboratorio (ring test) (1) (7) (10) (11) (12). È possibile utilizzare anche altre specie ben documentate, ad esempio *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). La durata complessiva dell'esposizione è di 44 giorni circa per *C. riparius* e *C. yoshimatsui* e di 100 giorni circa per *C. dilutus*.
2. Nel presente metodo di prova vengono descritte sia l'esposizione con acqua addizionata sia quella con sedimento addizionato. La scelta del sistema di esposizione appropriato dipende dalla finalità della prova. L'esposizione con acqua addizionata, che consiste nell'addizionare alla colonna d'acqua la sostanza in esame, è intesa a simulare la dispersione di pesticidi nebulizzati e copre il picco iniziale di concentrazione nelle acque superficiali. L'addizione in acqua è utile anche per altri tipi di esposizione (fuoriuscite di sostanze chimiche, ad esempio), ma non per i processi di accumulo nel sedimento con durata superiore a quella della prova. In questo caso, e anche quando il ruscellamento è la principale via d'ingresso dei pesticidi nei corpi idrici, può essere più opportuno ricorrere al sedimento addizionato. Qualora si desideri utilizzare un altro scenario di esposizione, il disegno sperimentale può essere facilmente adattato. Se ad esempio non si è interessati alla distribuzione della sostanza chimica in esame tra la fase acquosa e lo strato sedimentario ed è necessario ridurre al minimo l'assorbimento sul sedimento, si può pensare di utilizzare un sedimento di sostituzione artificiale (ad esempio la sabbia di quarzo).
3. Le sostanze chimiche che devono essere testate su organismi che vivono nei sedimenti possono permanere a lungo nel sedimento. L'esposizione di questi organismi può avvenire per diverse vie. L'importanza relativa di ogni via di esposizione e il tempo impiegato da ciascuna di esse per contribuire all'effetto tossico globale dipendono dalle proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica. Per le sostanze chimiche fortemente adsorbenti oppure per le sostanze chimiche che si legano in modo covalente al sedimento, l'ingestione di alimenti contaminati può costituire una via di esposizione importante. Per non sottovalutare la tossicità delle sostanze chimiche altamente lipofile, si può considerare l'opportunità di aggiungere cibo al sedimento prima di applicare la sostanza chimica in esame (cfr. paragrafo 31). Pertanto è possibile includere tutte le vie di esposizione e tutte le fasi di vita.
4. Gli endpoint misurati sono il numero totale di adulti emersi (sia per la prima che per la seconda generazione), la velocità di sviluppo (sia per la prima che per la seconda generazione), il rapporto numerico tra i sessi degli adulti completamente emersi e vivi (sia per la prima che per la seconda generazione), il numero di cordoni di uova per ciascuna femmina (solo per la prima generazione) e la fertilità dei cordoni di uova (solo per la prima generazione).
5. Si raccomanda vivamente di usare un sedimento artificiale, che presenta numerosi vantaggi rispetto a quelli naturali:
 - riduce la variabilità sperimentale, in quanto costituisce una "matrice standardizzata" riproducibile, ed elimina la necessità di trovare sedimenti puliti e incontaminati;
 - consente di effettuare le prove in qualsiasi momento dell'anno, senza che occorra tenere conto della variabilità stagionale dei sedimenti, e non richiede di essere trattato prima delle prove per eliminare la fauna indigena;
 - riduce i costi rispetto alla raccolta sul terreno di quantità sufficienti di sedimento per le prove di routine;
 - consente di mettere a confronto la tossicità delle sostanze chimiche tra studi differenti e di classificare tali sostanze di conseguenza (3).
6. L'appendice 1 contiene le definizioni di termini utili ai fini del presente metodo.

PRINCIPIO DELLA PROVA

7. Si espongono dei chironomidi al primo stadio larvale a un intervallo di concentrazioni della sostanza chimica in esame in un sistema sedimento-acqua. La prova inizia introducendo le larve al primo stadio (prima generazione) nei becher contenenti il sedimento addizionato; in alternativa, è possibile aggiungere la sostanza chimica in esame all'acqua dopo l'introduzione delle larve. Vengono quindi valutati l'emergenza dei chironomidi, il tempo intercorso fino alla loro emergenza e il rapporto numerico tra i sessi dei moscerini completamente emersi e vivi. Gli adulti emersi vengono trasferiti in gabbie di allevamento per facilitare lo sfarfallamento, l'accoppiamento e la deposizione delle uova. Vengono valutati il numero di cordoni di uova prodotti e la loro fertilità. Da questi cordoni di uova si ottengono le larve al primo stadio della seconda generazione. Esse sono collocate in becher preparati ex novo (con lo stesso processo di addizione utilizzato per la prima generazione) per determinare la vitalità della seconda generazione attraverso la valutazione dell'emergenza dei chironomidi, del tempo intercorso fino alla loro emergenza e del rapporto numerico tra i sessi dei moscerini completamente emersi e vivi (cfr. l'appendice 5 per una presentazione schematica della prova sul ciclo di vita). Tutti i dati sono analizzati tramite un modello di regressione per stimare la concentrazione che causerebbe una riduzione percentuale X dell'endpoint misurato oppure mediante verifica di un'ipotesi per determinare una concentrazione senza effetti osservabili (NOEC). Nel secondo caso occorre confrontare le risposte al trattamento con le pertinenti risposte dei controlli per mezzo di prove statistiche. Va osservato che nello scenario con acqua addizionata, in caso di utilizzo di sostanze chimiche che si degradano rapidamente, le successive fasi di vita di ciascuna generazione (ad esempio la fase pupale) possono essere esposte a un livello di concentrazione molto più basso nell'acqua sovrastante rispetto alle larve al primo stadio. Se ciò costituisce un problema ed è necessario un livello di esposizione simile per ciascuna fase di vita, si possono prendere in considerazione le seguenti modifiche del metodo di prova:
- esecuzioni parallele con addizione in vari stadi del ciclo di vita oppure
 - sistema sperimentale con addizione ripetuta (o rinnovo dell'acqua sovrastante) in entrambe le fasi di prova (prima e seconda generazione) e regolazione degli intervalli di addizione (rinnovo) in funzione delle caratteristiche di evoluzione della sostanza chimica in esame.

Tali modifiche possono essere apportate esclusivamente nello scenario con acqua addizionata, non in quello con sedimento addizionato.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA CHIMICA IN ESAME

8. È necessario conoscere la solubilità in acqua e la tensione di vapore della sostanza chimica in esame, il K_{ow} , il coefficiente di ripartizione misurato o calcolato nel sedimento e la stabilità nell'acqua e nel sedimento. Per la quantificazione della sostanza chimica in esame nell'acqua sovrastante, nell'acqua interstiziale e nel sedimento occorre inoltre avvalersi di un metodo analitico affidabile, di cui devono essere noti e riportati nella relazione l'accuratezza e il limite di rivelabilità. È anche utile conoscere la formula strutturale e la purezza della sostanza chimica in esame, come pure il suo destino chimico (ad esempio, dissipazione, degradazione abiotica e biotica ecc.). Ulteriori orientamenti per testare le sostanze chimiche con proprietà fisico-chimiche che rendono difficoltosa l'esecuzione delle prove sono contenuti in (16).

SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

9. Per assicurarsi che la sensibilità della popolazione di laboratorio non sia cambiata, è possibile testare regolarmente le sostanze chimiche di riferimento. Come per le dafnidi, sarebbe sufficiente eseguire una prova di tossicità acuta di 48 ore (cfr. il riferimento 17). Tuttavia, in attesa che diventi disponibile una linea guida convalidata per la tossicità acuta, si può effettuare una prova di tossicità cronica seguendo le indicazioni fornite nel capitolo C.28 del presente all'allegato. Tra le sostanze tossiche di riferimento utilizzate con successo in prove interlaboratorio e studi di validazione vi sono: lindano, trifluralin, pentaclorofenolo, cloruro di cadmio e cloruro di potassio. (1) (3) (6) (7) (18).

VALIDITÀ DELLA PROVA

10. Perché la prova sia valida devono realizzarsi le seguenti condizioni:
- l'emergenza media nel controllo trattato deve essere pari ad almeno il 70 % al termine del periodo di esposizione per entrambe le generazioni (1) (7);
 - per quanto riguarda *C. riparius* e *C. yoshimatsui*, l'85 % dell'emergenza di tutti i moscerini adulti del controllo trattato in entrambe le generazioni deve avvenire tra i 12 e i 23 giorni successivi all'introduzione delle larve al primo stadio nei recipienti; per *C. dilutus* è accettabile un periodo compreso tra i 20 e i 65 giorni;

- il rapporto numerico tra i sessi degli adulti completamente emersi e vivi (proporzione di femmine o di maschi) nel controllo trattato per entrambe le generazioni deve essere in media pari almeno a 0,4, ma non superiore a 0,6;
- per ciascuna gabbia di allevamento, il numero di cordoni di uova nei controlli della prima generazione deve essere pari almeno a 0,6 per ciascuna femmina aggiunta alla gabbia;
- la proporzione di cordoni di uova fertili in ciascuna gabbia di allevamento dei controlli della prima generazione deve essere pari almeno a 0,6;
- alla fine del periodo di esposizione per entrambe le generazioni si devono misurare il pH e la concentrazione dell'ossigeno dissolto in ogni recipiente. La concentrazione dell'ossigeno deve essere pari ad almeno il 60 % del suo valore di saturazione dell'aria (ASV⁽¹⁾) e il pH dell'acqua sovrastante deve essere compreso tra 6 e 9 in tutti i recipienti di prova;
- la temperatura dell'acqua non deve variare di oltre ± 1,0 °C.

DESCRIZIONE DEL METODO

Recipienti di prova e gabbie di allevamento

11. Le larve sono esposte in becher di vetro da 600 ml, aventi un diametro di circa 8,5 cm (cfr. appendice 5). Possono essere utilizzati anche altri recipienti, purché garantiscano profondità sufficiente ad accogliere il sedimento e l'acqua sovrastante. La superficie del sedimento deve essere tale da offrire uno spazio da 2 a 3 cm² per larva. Lo spessore dello strato sedimentario e la profondità dell'acqua sovrastante devono essere in rapporto 1:4. Bisogna utilizzare gabbie di allevamento (di 30 cm minimo per ciascuna delle tre dimensioni) in cui la parte superiore e almeno un lato siano ricoperti di una garza (a maglie di circa 1 mm) (cfr. appendice 5). In ciascuna gabbia va posizionato un cristallizzatore da 2 l per la deposizione contenente un sistema di prova acqua-sedimento. Anche per il cristallizzatore, lo spessore dello strato sedimentario e la profondità dell'acqua sovrastante devono essere in rapporto 1:4. Dopo essere stati raccolti dal cristallizzatore, i cordoni di uova sono trasferiti su una piastra per microutilolazione a 12 pozzi (un cordone per pozzetto contenente almeno 2,5 ml di acqua prelevata dal cristallizzatore in cui è stato eseguito il processo di addizione), chiusa con un coperchio per evitare un'evaporazione significativa. È possibile utilizzare anche altri recipienti idonei alla conservazione dei cordoni di uova. Ad eccezione delle piastre per microutilolazione, tutti i recipienti di prova e gli altri apparecchi destinati ad entrare in contatto con il sistema di prova devono essere interamente di vetro o di altro materiale chimicamente inerte (ad esempio politetrafluoroetilene).

Selezione delle specie

12. La specie che meglio si presta a questa prova è *Chironomus riparius*. Si può utilizzare anche *C. yoshimatsui*. *C. dilutus* è altrettanto adatto, sebbene sia più difficile da manipolare e richieda un periodo di prova più lungo. Le istruzioni sul metodo di allevamento di *C. riparius* figurano nell'appendice 2. Sono reperibili informazioni anche sulle condizioni di allevamento delle specie *C. dilutus* (5) e *C. yoshimatsui* (14). Occorre identificare la specie prima dell'avvio della sperimentazione, ma non è necessario farlo prima di ogni singola prova se gli organismi provengono dal laboratorio che esegue la sperimentazione.

Sedimento

13. Si utilizza di preferenza sedimento artificiale. Se si sceglie di utilizzare un sedimento naturale, occorre caratterizzarlo, almeno quanto a pH e tenore di carbonio organico (la determinazione di altri parametri, come il rapporto C/N e la granulometria, è altrettanto raccomandata), e assicurarsi che sia esente da ogni contaminazione e da altri organismi che potrebbero entrare in competizione con le larve di chironomidi o consumarle. Prima di eseguire la prova, si raccomanda inoltre di mantenere i sedimenti per sette giorni nelle stesse condizioni in cui verrà effettuata la prova. Si raccomanda di utilizzare il sedimento artificiale descritto in (1), costituito secondo la seguente formula (1) (20) (21):

- a. 4-5 % (peso secco) di torba, con un pH che si avvicini il più possibile a un valore compreso tra 5,5 e 6,0; è importante utilizzare torba sotto forma di polvere, finemente macinata (granulometria ≤ 1 mm) ed essiccata unicamente all'aria;
- b. 20 % (peso secco) di argilla caolinica (tenore di caolinite di preferenza superiore al 30 %);

⁽¹⁾ A 20 °C e alla pressione atmosferica normale, l'ASV in acqua dolce è uguale a 9,1 mg/l (il 60 % corrisponde a 5,46 mg/l).

- c. 75-76 % (peso secco) di sabbia di quarzo (composta in prevalenza da sabbia fine, con oltre il 50 % delle particelle di granulometria tra 50 e 200 µm);
 - d. aggiunta di acqua deionizzata fino ad ottenere un tenore di umidità della miscela finale del 30–50 %;
 - e. aggiunta di carbonato di calcio di qualità chimicamente pura (CaCO_3) per aggiustare il pH della miscela finale del sedimento a $7,0 \pm 0,5$;
 - f. il tenore di carbonio organico della miscela finale dovrà essere del 2 % ($\pm 0,5$ %), ottenuto aggiungendo le dovute quantità di torba e sabbia, come indicato in a) e c).
14. Il luogo di provenienza di torba, argilla caolinica e sabbia deve essere noto. Occorre verificare che i componenti del sedimento non siano contaminati da sostanze chimiche (ad esempio metalli pesanti, composti organoclorurati, composti organofosforici). Un esempio di preparazione del sedimento artificiale figura nell'appendice 3. I componenti possono anche essere mescolati allo stato secco, purché si dimostri che dopo l'aggiunta dell'acqua sovrastante non si separino (ad esempio, particelle di torba in sospensione) e che la torba o il sedimento siano condizionati a sufficienza.

Acqua

15. Le acque che presentano le caratteristiche chimiche indicate nelle appendici 2 e 4 per un'acqua di diluizione accettabile sono considerate adatte per le prove. È possibile utilizzare come acqua di allevamento e acqua di prova ogni tipo di acqua adatta, quali acqua naturale (di superficie o freatica), ricostituita (cfr. appendice 2) o di rubinetto non clorata, se i chironomidi riescono a sopravvivervi per la durata dell'allevamento e della prova senza manifestare segni di stress. All'inizio della prova, il pH dell'acqua di prova dev'essere compreso tra 6 e 9 e la durezza totale dell'acqua non dev'essere superiore a 400 mg/l (come CaCO_3). Utilizzare però un'acqua meno dura se si sospetta che vi sia un'interazione tra gli ioni che determinano la durezza e la sostanza chimica in esame (in tal caso, il mezzo Elendt M4 non può essere usato). Utilizzare lo stesso tipo di acqua nel corso di tutta la prova. Le caratteristiche della qualità dell'acqua indicate nell'appendice 4 vanno misurate almeno due volte l'anno oppure quando si sospetta che abbiano subito un'alterazione significativa.

Soluzioni madre — acqua addizionata

- 16.a. Le concentrazioni di prova sono calcolate in base alle concentrazioni della colonna d'acqua, ossia l'acqua sovrastante il sedimento. Le soluzioni di prova alle concentrazioni prescelte vanno in genere preparate per diluizione di una soluzione madre. Le soluzioni madre devono essere preparate preferibilmente sciogliendo la sostanza chimica in esame nell'acqua di prova. In alcuni casi può rendersi necessario l'uso di solventi o disperdenti per ottenere una soluzione madre di adeguata concentrazione. Tra i solventi che si possono usare vi sono: acetone, etere monoetilico del glicol etilenico, etere dimetilico del glicol etilenico, dimetilformammide e glicol trietilenico. Disperdenti utilizzabili sono Cremophor RH40, Tween 80, metilcellulosa 0,01 % e HCO-40. La concentrazione dell'agente solubilizzante nel mezzo di prova finale deve essere minima (ossia $\leq 0,1 \text{ ml/l}$) e identica in tutti i trattamenti. Qualora si utilizzi un agente solubilizzante, questo non deve avere effetti significativi sulla sopravvivenza, effetti che si desumono dall'osservazione di un controllo con solvente rispetto a un controllo negativo (acqua). L'uso di questi materiali dovrebbe tuttavia essere evitato il più possibile.

Soluzioni madre — sedimento addizionato

16. b. I sedimenti addizionati (alla concentrazione desiderata) vengono generalmente preparati aggiungendo una soluzione della sostanza chimica in esame direttamente al sedimento. La soluzione madre della sostanza chimica in esame disciolta in acqua deionizzata viene mescolata con il sedimento artificiale mediante un laminatoio, un miscelatore per mangimi oppure a mano. Se scarsamente solubile in acqua, la sostanza chimica in esame può essere disciolta nel minor volume possibile di un solvente organico idoneo (per esempio esano, acetone, cloroformio). La soluzione ottenuta va poi mischiata con 10 g di sabbia di quarzo fine per ciascun recipiente di prova. Il solvente va lasciato evaporare e deve essere completamente eliminato dalla sabbia; la sabbia va poi mescolata alla quantità di sedimento idonea. Per solubilizzare, disperdere o emulsionare la sostanza chimica in esame, si possono impiegare soltanto agenti che volatilizzano rapidamente. Occorre tener conto, al momento di preparare il sedimento, della sabbia contenuta nella

sostanza chimica in esame e nella miscela di sabbia (il sedimento, quindi, va preparato utilizzando meno sabbia). Occorre fare attenzione affinché la sostanza chimica in esame aggiunta al sedimento sia perfettamente e omogeneamente distribuita al suo interno. Se necessario, analizzare dei sottocampioni per verificare il grado di omogeneità.

DISEGNO SPERIMENTALE

17. Il disegno sperimentale comprende la selezione del numero di concentrazioni di prova e dell'intervallo fra esse, del numero di recipienti per ciascuna concentrazione, del numero di larve per recipiente e del numero di cristallizzatori e di gabbie di allevamento. Di seguito è descritto il disegno per stabilire i valori EC_x e NOEC ed eseguire una prova limite.

Disegno per l'analisi di regressione

18. La prova deve coprire la concentrazione efficace (EC_x) e l'intervallo delle concentrazioni alle quali la sostanza chimica in esame produce un effetto interessante, in modo tale che l'endpoint non sia estrapolato al di fuori dei limiti dei dati generati. Bisogna evitare di estrapolare risultati molto al di sotto della concentrazione minima o al di sopra di quella massima. Può essere utile eseguire una prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni, conformemente ai metodi di prova descritti nel capitolo C.27 o nel capitolo C.28, al fine di selezionare un intervallo di concentrazioni di prova idoneo.
19. Per determinare il valore EC_x sono necessarie almeno cinque concentrazioni e otto repliche per ciascuna concentrazione. Per ogni concentrazione bisogna utilizzare due gabbie di allevamento (A e B). Le otto repliche vanno divise in due gruppi di quattro repliche (un gruppo per gabbia). Il raggruppamento delle repliche è necessario a causa del numero di moscerini di cui c'è bisogno nella gabbia per ottenere valutazioni affidabili della riproduzione. Anche la seconda generazione presenta otto repliche, ottenute a partire dalle popolazioni esposte nelle gabbie di allevamento. Il fattore tra una concentrazione e l'altra non deve essere maggiore di due (salvo nel caso in cui la curva dose/risposta sia poco accentuata). Il numero di repliche per trattamento può essere ridotto a sei (tre per ogni gabbia di allevamento) se si aumenta il numero di concentrazioni di prova che danno risposte diverse. L'aumento del numero di repliche o la riduzione degli intervalli delle concentrazioni tende a ridurre gli intervalli di confidenza intorno alla concentrazione efficace (EC_x).

Disegno per la stima di una NOEC

20. Per stimare la NOEC sono necessarie cinque concentrazioni di prova con almeno otto repliche (quattro per ogni gabbia di allevamento, A e B) e il fattore tra una concentrazione e l'altra non deve essere maggiore di due. Il numero di repliche deve essere tale da garantire una potenza statistica sufficiente a rilevare una differenza del 20 % rispetto al controllo, applicando una significatività statistica del 5 % ($\alpha = 0,05$). Per quanto riguarda la velocità di sviluppo, la fecondità e la fertilità, è in genere appropriata un'analisi della varianza (ANOVA), seguita dal test di Dunnett o dal test di Williams (22-25). Per il tasso di emergenza e il rapporto numerico tra i sessi si può utilizzare il test di Cochran-Armitage, il test esatto di Fisher (con correzione secondo Bonferroni) o il test di Mantel-Haentzel.

Prova limite

21. Se la prova preliminare facoltativa per determinare l'intervallo delle concentrazioni non ha prodotto alcun effetto a una concentrazione massima, si può eseguire una prova limite (una concentrazione di prova e uno o più controlli). Scopo della prova limite è indicare che gli eventuali effetti tossici della sostanza chimica in esame si verificano a livelli superiori rispetto alla concentrazione limite testata. Le quantità raccomandate sono 100 mg/l per l'acqua e 1 000 mg/kg (peso secco) per il sedimento. Di norma è necessario allestire otto repliche sia per gli organismi trattati sia per quelli di controllo. Occorre dimostrare che la potenza statistica è sufficiente a rilevare una differenza del 20 % rispetto al controllo, applicando una significatività statistica del 5 % ($\alpha = 0,05$). Per quanto concerne le risposte metriche (ad esempio, in termini di velocità di sviluppo), il test t costituisce un metodo statistico idoneo se i dati rispettano le condizioni imposte da questo test (normalità, varianze omogenee). In caso contrario, si può ricorrere a un test t per varianze disuguali o a un test non parametrico, come il test di Wilcoxon-Mann-Whitney. Quanto al tasso di emergenza, il test esatto di Fisher è appropriato.

PROCEDURA

Condizioni di esposizione*Preparazione del sistema acqua-sedimento (acqua addizionata)*

22. a. In ciascun recipiente di prova e nel cristallizzatore viene aggiunto un sedimento artificiale (si vedano i paragrafi 13-14 e l'appendice 3) in modo da formare uno strato di almeno 1,5 cm (nel cristallizzatore lo strato può essere un po' più basso) ma non superiore a 3 cm. Viene aggiunta dell'acqua (cfr. paragrafo 15) facendo in modo che il rapporto tra lo spessore dello strato sedimentario e la profondità dell'acqua non sia superiore a 1:4. Dopo aver preparato i recipienti di prova, il sistema sedimento-acqua è posto in moderata aerazione per circa sette giorni prima di introdurvi le larve al primo stadio della prima o della seconda generazione (cfr. paragrafo 14 e appendice 3). Il sistema sedimento-acqua dei cristallizzatori non è aerato durante la prova, dal momento che non deve assicurare la sopravvivenza delle larve (i cordoni di uova vengono raccolti prima della schiusa). Per evitare la separazione degli ingredienti del sedimento e la risospensione delle particelle fini durante l'aggiunta dell'acqua, si può ricoprire il sedimento con un disco di plastica durante l'operazione di riempimento della colonna d'acqua, per poi ritirarlo a operazione completata. Possono essere utilizzati anche altri dispositivi.

Preparazione del sistema acqua-sedimento (sedimento addizionato)

22. b. I sedimenti addizionati preparati seguendo la procedura descritta al paragrafo 16b vengono posti nei recipienti e nel cristallizzatore e viene aggiunta acqua sovrastante per produrre un rapporto volumetrico sedimento-acqua di 1:4. Lo spessore dello strato sedimentario deve essere compreso tra 1,5 e 3 cm (nel cristallizzatore lo strato può essere un po' più basso). Per evitare la separazione degli ingredienti del sedimento e la risospensione delle particelle fini durante l'aggiunta dell'acqua, si può ricoprire il sedimento con un disco di plastica durante l'operazione di riempimento della colonna d'acqua, per poi ritirarlo a operazione completata. Possono essere utilizzati anche altri dispositivi. Dopo aver preparato il sedimento addizionato sovrastato da uno strato d'acqua, è preferibile lasciare che la sostanza chimica in esame si ripartisca tra il sedimento e la fase acquosa (4) (5) (7) (18); di preferenza, ciò dovrebbe avvenire nelle stesse condizioni di temperatura e aerazione utilizzate nella prova. Il tempo di equilibratura può durare alcune ore, dei giorni o, in rari casi, fino a cinque settimane, a seconda del sedimento e della sostanza chimica. Non occorre attendere il raggiungimento dell'equilibrio, perché molte sostanze chimiche rischiano di degradarsi nel corso di questo periodo, ma è raccomandato un tempo di attesa di 48 ore, che può essere esteso se l'emivita di degradazione della sostanza chimica nel sedimento è notoriamente lunga (cfr. paragrafo 8). Al termine di questo periodo di equilibratura, occorre misurare la concentrazione della sostanza chimica in esame nell'acqua sovrastante, nell'acqua interstiziale e nel sedimento, almeno alla concentrazione massima e a una più bassa (cfr. paragrafo 38). Tali misurazioni analitiche della sostanza chimica in esame consentono di calcolare il bilancio di massa e di esprimere i risultati in funzione delle concentrazioni misurate.
23. I recipienti di prova così allestiti devono essere coperti (ad esempio, da piastre di vetro). Nel corso della prova si provvederà, all'occorrenza, ad aggiungere l'acqua necessaria a mantenere il volume originario per compensare l'evaporazione, avendo cura di utilizzare acqua distillata o deionizzata per evitare l'accumulo di sali. I cristallizzatori nelle gabbie di allevamento non sono coperti; è possibile, sebbene non indispensabile, aggiungere nuovamente l'acqua perduta nel corso della prova, dal momento che i cordoni di uova sono in contatto con l'acqua solo per un giorno circa e i cristallizzatori sono utilizzati unicamente in una breve fase della prova.

Introduzione degli organismi di prova

24. Quattro o cinque giorni prima di introdurre le larve al primo stadio per la prima generazione, si prelevano dagli allevamenti ammassi di uova e li si depositano in recipienti piccoli contenenti mezzo di coltura. Si può utilizzare il mezzo vecchio prelevato dalla coltura madre o un mezzo fresco. In ogni caso, si aggiunge una piccola quantità di cibo, ad esempio qualche goccia di filtrato di una sospensione di mangime per pesci in fiocchi (cfr. appendice 2). Si devono utilizzare solo ammassi di uova appena depositi. Di solito le larve compaiono qualche giorno dopo la deposizione delle uova (da 2 a 3 giorni per *C. riparius* a 20 °C e da 1 a 4 giorni per *C. dilutus* a 23 °C e *C. yoshimatsui* a 25 °C) e la loro crescita avviene in quattro stadi, ciascuno di una durata compresa tra 4 e 8 giorni. Questa prova si esegue al primo stadio larvale (massimo 48 ore dopo la schiusa). È possibile verificare lo stadio di sviluppo delle larve in base alle dimensioni della capsula céfalica (7).

25. In ciascun recipiente contenente il sistema sedimento-acqua si distribuiscono casualmente, per mezzo di una pipetta smussata, venti larve al primo stadio per la prima generazione. L'aerazione dell'acqua è interrotta per 24 ore a partire dal momento in cui le larve sono introdotte nei recipienti (cfr. paragrafo 32). In base al disegno sperimentale adottato (cfr. paragrafi 19 e 20), il numero di larve utilizzate per ciascuna concentrazione è almeno 120 (6 repliche per concentrazione) per la determinazione del valore EC_x e 160 (8 repliche per concentrazione) per la determinazione della NOEC. Nella procedura in cui si utilizza sedimento addizionato, l'esposizione inizia con l'introduzione delle larve.

Aggiunta della sostanza all'acqua sovrastante

26. Ventiquattr'ore dopo avere introdotto le larve al primo stadio per la prima generazione, la sostanza chimica in esame è aggiunta nella colonna d'acqua sovrastante e i recipienti vengono di nuovo sottoposti a moderata aerazione (per eventuali modifiche del disegno sperimentale, fare riferimento al paragrafo 7). Piccoli volumi delle soluzioni madre contenenti la sostanza chimica in esame sono iniettati sotto la superficie dell'acqua con l'ausilio di una pipetta. In seguito si mescola delicatamente l'acqua sovrastante, con la dovuta cautela per evitare la risospensione del sedimento. Nella procedura in cui si utilizza acqua addizionata, l'esposizione inizia con l'aggiunta della sostanza nell'acqua (ossia un giorno dopo l'introduzione delle larve).

Raccolta degli adulti emersi

27. I moscerini emersi della prima generazione sono raccolti almeno una volta, ma preferibilmente due volte, al giorno (cfr. punto 36) dai recipienti di prova utilizzando un aspiratore, un estrattore o un dispositivo analogo (cfr. appendice 5). È necessario procedere con estrema cautela per non danneggiare gli adulti. I moscerini raccolti dai quattro recipienti di prova sottoposti allo stesso trattamento sono trasferiti in una gabbia di allevamento loro attribuita in precedenza. Il giorno in cui emergono i primi moscerini (maschi), sotto la superficie dell'acqua nei cristallizzatori viene iniettata con l'ausilio di una pipetta una piccola quantità di soluzione madre contenente la sostanza chimica in esame (disegno sperimentale con acqua addizionata). In seguito si mescola delicatamente l'acqua sovrastante, con la dovuta cautela per evitare la risospensione del sedimento. Il valore nominale della concentrazione della sostanza chimica in esame nel cristallizzatore è uguale a quello dei recipienti trattati assegnati alla rispettiva gabbia di allevamento. Nella procedura in cui si utilizza sedimento addizionato, i cristallizzatori sono preparati all'incirca l'undicesimo giorno dopo l'inizio dell'esposizione (ossia dall'introduzione delle larve della prima generazione), in modo tale che l'equilibrio possa essere raggiunto circa 48 ore prima della deposizione dei primi cordoni di uova.
28. I cordoni di uova sono prelevati dal cristallizzatore nella gabbia di allevamento utilizzando delle pinzette o una pipetta smussata. Ogni cordone viene posto in un recipiente contenente un mezzo di coltura proveniente dal cristallizzatore da cui è stato prelevato (ad esempio uno dei 12 pozzi di una piastra per microtilazione con almeno 2,5 ml di mezzo). I recipienti contenenti i cordoni di uova vengono chiusi con un coperchio per evitare un'evaporazione significativa. I cordoni di uova sono tenuti sotto osservazione per almeno sei giorni dopo la deposizione, al fine di poterli classificare come fertili o sterili.

Per far partire la seconda generazione, da ciascuna gabbia di allevamento vengono selezionati almeno tre (ma preferibilmente sei) cordoni di uova fertili, che vengono fatte schiudere dopo aver fornito del nutrimento. Tali cordoni di uova devono essere stati prodotti nel periodo di picco della deposizione, che normalmente corrisponde all'incirca al diciannovesimo giorno della prova nei controlli. Idealmente, tutti i trattamenti sulla seconda generazione iniziano lo stesso giorno; tuttavia, a causa degli effetti legati alle sostanze chimiche sullo sviluppo delle larve, ciò non sempre è possibile. In tal caso, è possibile iniziare i trattamenti con le concentrazioni più elevate successivamente ai trattamenti con le concentrazioni più basse e il controllo (con solvente).

29. a. Nella procedura in cui si utilizza acqua addizionata, il sistema sedimento-acqua per la seconda generazione viene preparato aggiungendo la sostanza chimica in esame nella colonna dell'acqua sovrastante circa un'ora prima di aggiungere le larve al primo stadio ai recipienti di prova. Piccoli volumi delle soluzioni contenenti la sostanza chimica in esame sono iniettati sotto la superficie dell'acqua con l'ausilio di una pipetta. In seguito si mescola delicatamente l'acqua sovrastante, con la dovuta cautela per evitare la risospensione del sedimento. Dopo l'addizione i recipienti vengono sottoposti a moderata aerazione.
29. b. Nella procedura in cui si utilizza sedimento addizionato, i recipienti di esposizione contenenti il sistema sedimento-acqua per la seconda generazione sono preparati allo stesso modo di quelli per la prima generazione.
30. In ciascun recipiente di prova contenente il sistema acqua-sedimento addizionato si distribuiscono casualmente, per mezzo di una pipetta smussata, venti larve al primo stadio (al massimo 48 ore dopo la

schiusa) per la seconda generazione. L'aerazione dell'acqua deve essere interrotta per 24 ore dal momento dell'introduzione delle larve al primo stadio nei recipienti di prova. In base al disegno sperimentale adottato (cfr. paragrafi 19 e 20), il numero di larve utilizzate per ciascuna concentrazione è almeno 120 (6 repliche per concentrazione) per la determinazione del valore EC_x e 160 (8 repliche per concentrazione) per la determinazione della NOEC.

Alimentazione

31. Le larve presenti nei recipienti di prova devono essere nutriti, di preferenza ogni giorno o almeno tre volte la settimana. Durante i primi 10 giorni del loro sviluppo l'alimentazione giornaliera adeguata per le giovani larve consiste in 0,25—0,5 mg (0,35—0,5 mg per *C. yoshimatsui*) pro capite di mangime per pesci (sospensione acquosa o finemente macinato, del tipo Tetra-Min o Tetra-Phyll; cfr. appendice 2). Può essere necessario aumentare leggermente la dose per le larve più vecchie: 0,5-1,0 mg per larva al giorno dovrebbe essere sufficiente per il resto della prova. Occorre diminuire la razione di cibo di tutti gli organismi trattati e dei controlli se si osserva la comparsa di funghi o il decesso di organismi di controllo. Se non si riesce ad arrestare lo sviluppo fungino occorre ripetere la prova.

La rilevanza tossicologica dell'esposizione per ingestione è generalmente più alta nelle sostanze chimiche con un'elevata affinità per il carbonio organico o nelle sostanze chimiche che si legano in modo covalente con il sedimento. Pertanto quando si eseguono prove su sostanze chimiche con tali proprietà, la quantità di cibo necessaria alla sopravvivenza e alla crescita naturale delle larve può essere aggiunta al sedimento artificiale prima del periodo di stabilizzazione, a seconda della regolamentazione in vigore. Per evitare che la qualità dell'acqua si deteriori, è necessario sostituire il mangime per pesci con alimenti vegetali, ad esempio 0,5 % (peso secco) di foglie finemente macinate di ortica (*Urtica dioica*), gelso (*Morus alba*), trifoglio bianco (*Trifolium repens*), spinacio (*Spinacia oleracea*) o di altro materiale vegetale (*Cerophyl* o alfa cellulosa). L'aggiunta dell'intera razione di cibo organico al sedimento prima dell'addizione non è una questione irrilevante in relazione alla qualità dell'acqua e alle sue prestazioni biologiche (21), né rappresenta un metodo standardizzato, ma recenti studi indicano che questo metodo funziona (19) (26). I moscerini adulti nella gabbia di allevamento normalmente non hanno bisogno di essere alimentati, ma la fecondità e la fertilità aumentano se si utilizza un tampone di ovatta imbevuto di una soluzione satura di saccarosio come mezzo di alimentazione per gli adulti emersi (34).

Condizioni di incubazione

32. L'acqua sovrastante dei recipienti di prova è sottoposta a una moderata aerazione, a partire da 24 ore dopo l'introduzione delle larve al primo stadio di entrambe le generazioni e fino alla fine della prova (avendo cura che la concentrazione di ossigeno disciolto non scenda sotto il 60 % del valore di saturazione dell'aria). L'aria è insufflata tramite pipette Pasteur in vetro la cui estremità è fissata a 2-3 cm sopra lo strato di sedimento (nella misura di alcune bolle al secondo). Se la sostanza chimica in esame è volatile si può evitare di aerare il sistema sedimento-acqua, a condizione di rispettare il criterio di validità del 60 % minimo del valore di saturazione dell'aria (paragrafo 10). Ulteriori informazioni sono riportate nel riferimento (16).
33. La prova su *C. riparius* è effettuata a una temperatura costante di 20 °C (± 2 °C). Per *C. dilutus* e *C. yoshimatsui* la temperatura consigliata è rispettivamente 23 °C e 25 °C (± 2 °C). Il fotoperiodo è di 16 ore e l'intensità luminosa è compresa tra 500 e 1 000 lux. Per le gabbie di allevamento è possibile prevedere una fase supplementare, della durata di un'ora, che riproduce l'alba e il tramonto.

Durata dell'esposizione

34. Disegno sperimentale con acqua addizionata: il periodo di esposizione della prima generazione inizia quando la sostanza chimica in esame viene aggiunta nell'acqua sovrastante dei recipienti di prova (vale a dire un giorno dopo l'introduzione delle larve; per eventuali modifiche del protocollo di esposizione, fare riferimento al paragrafo 7). L'esposizione della seconda generazione di larve ha inizio immediatamente, poiché queste sono introdotte in un sistema sedimento-acqua già addizionato. Per *C. riparius* e *C. yoshimatsui*, la durata massima dell'esposizione per la prima generazione è di 27 giorni, mentre per la seconda generazione è di 28 giorni (le larve della prima generazione passano un giorno nei recipienti senza essere esposte). Considerando la sovrapposizione, la durata complessiva della prova è di circa 44 giorni. Per *C. dilutus* la durata massima dell'esposizione per la prima e la seconda generazione è rispettivamente di 64 e 65 giorni. La durata complessiva è di circa 100 giorni.

Disegno sperimentale con sedimento addizionato: l'esposizione ha inizio con l'introduzione delle larve e ha una durata massima di 28 giorni per entrambe le generazioni di *C. riparius* e *C. yoshimatsui* e di 65 giorni per entrambe le generazioni di *C. dilutus*.

Osservazioni

Emergenza

35. Si deve determinare il tempo di sviluppo e il numero totale di moscerini maschi e femmine completamente emersi e vivi. I maschi si distinguono facilmente perché dotati di antenne piumate e di una struttura corporea esile.
36. I recipienti di prova di entrambe le generazioni vanno osservati almeno tre volte la settimana, per verificare che le larve non presentino attività anomala (abbandono del sedimento, movimenti natatori insoliti ecc.) rispetto al controllo. Durante il periodo dell'emergenza, che inizia circa 12 giorni dopo l'introduzione delle larve per *C. riparius* e *C. yoshimatsui* (dopo 20 giorni per *C. dilutus*), è necessario contare i moscerini emersi e registrarne il sesso almeno una volta, ma preferibilmente due volte, al giorno (la mattina presto e nel tardo pomeriggio). Una volta identificati, i moscerini della prima generazione sono rimossi con cautela dai recipienti e trasferiti in una gabbia di allevamento. I moscerini della seconda generazione sono rimossi e soppressi in seguito all'identificazione. I cordoni di uova depositi nei recipienti di prova della prima generazione devono essere raccolti individualmente e trasferiti con almeno 2,5 ml di acqua originaria in piastre per microtitolazione a 12 pozzetti o in altri recipienti idonei, chiusi con un coperchio per evitare un'evaporazione significativa. Va registrato anche il numero delle larve morte e delle pupe visibili che non sono riuscite ad emergere. L'appendice 5 contiene esempi di gabbia di allevamento, recipiente di prova ed estrattore.

Riproduzione

37. Gli effetti sulla riproduzione sono valutati osservando il numero di cordoni di uova prodotti dalla prima generazione di moscerini e la fertilità di tali cordoni. Una volta al giorno i cordoni di uova sono raccolti dal cristallizzatore posto in ciascun contenitore di allevamento e trasferiti, con almeno 2,5 ml di acqua originaria, in una piastra per microtitolazione a 12 pozzetti (un cordone in ciascun pozzetto) o in altri recipienti idonei, chiusi con un coperchio per evitare un'evaporazione significativa. Per ogni cordone di uova sono documentate le seguenti caratteristiche: giorno di produzione, dimensioni (normali, ossia $1,0 \pm 0,3$ cm, o piccole, generalmente $\leq 0,5$ cm), struttura (normale = a forma di banana con cordone a spirale, o anormale, ad esempio cordone non a spirale) e fertilità (fertile o sterile). La fertilità di un cordone di uova viene valutata nel corso dei sei giorni successivi alla deposizione. Un cordone è ritenuto fertile se il numero di uova che si schiudono corrisponde almeno a un terzo. Il numero totale di femmine aggiunte nella gabbia di allevamento serve a calcolare il numero di cordoni di uova per ciascuna femmina e il numero di cordoni di uova fertili per ciascuna femmina. Se necessario, il numero di uova in un cordone può essere stimato ricorrendo al metodo non distruttivo del conteggio degli anelli (descritto in dettaglio nei riferimenti 32 e 33).

Misurazioni analitiche

Concentrazione della sostanza chimica in esame

38. Occorre analizzare, come minimo, dei campioni dell'acqua sovrastante, dell'acqua interstiziale e del sedimento all'inizio dell'esposizione (in caso di acqua addizionata, di preferenza un'ora dopo l'applicazione della sostanza in esame) e alla fine della prova, per la concentrazione massima e per una più bassa. Ciò vale per i recipienti di entrambe le generazioni. Per i cristallizzatori posti nella gabbia di allevamento viene analizzata solo l'acqua sovrastante, poiché è con questa che i cordoni di uova entrano in contatto (nel caso del disegno sperimentale con sedimento addizionato, è possibile prendere in considerazione una conferma analitica della concentrazione del sedimento). Se ritenuto necessario, durante la prova è possibile effettuare ulteriori misurazioni relative al sedimento, all'acqua interstiziale o all'acqua sovrastante. La concentrazione della sostanza chimica in esame ci informa sul comportamento/sulla ripartizione della sostanza nel sistema acqua-sedimento. Per il campionamento del sedimento e dell'acqua interstiziale all'inizio della prova e nel corso della stessa (cfr. paragrafo 39) sono necessari recipienti di prova supplementari per eseguire le determinazioni analitiche. Non è indispensabile analizzare il sedimento nel disegno sperimentale con acqua addizionata se la ripartizione della sostanza chimica in esame tra l'acqua e il sedimento è stata chiaramente determinata con uno studio acqua/sedimento condotto in condizioni analoghe (ad esempio rapporto sedimento/acqua, tipo di applicazione, tenore di carbonio organico del sedimento) o se le concentrazioni misurate nell'acqua sovrastante restano tra l'80 e il 120 % dei valori nominali o misurati inizialmente.
39. Quando si effettuano misurazioni intermedie (ad esempio, al settimo e/o al quattordicesimo giorno) e se l'analisi richiede campioni voluminosi che non possono essere prelevati dai recipienti di prova senza influire sull'impianto sperimentale, le determinazioni analitiche sono praticate su campioni prelevati da recipienti di prova supplementari trattati allo stesso modo (anche per quanto riguarda la presenza di organismi di prova) ma non utilizzati per le osservazioni biologiche.

40. Per isolare l'acqua interstiziale si raccomanda di centrifugare i campioni, ad esempio 10 000 g a 4 °C per 30 minuti. Se però è dimostrato che la sostanza chimica in esame non assorbe sui filtri, è accettabile anche la filtrazione. In alcuni casi, se il volume dei campioni è troppo piccolo, può rivelarsi impossibile analizzare le concentrazioni nell'acqua interstiziale.

Parametri fisici e chimici

41. Il pH, l'ossigeno dissolto nell'acqua di prova e la temperatura dell'acqua nei recipienti di prova e nei cristallizzatori devono essere debitamente misurati (cfr. paragrafo 10). All'inizio e alla fine della prova è necessario misurare la durezza dell'acqua e il tenore di ammoniaca nei controlli e in un recipiente di prova e un cristallizzatore trattati alla concentrazione massima.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

42. Scopo della presente prova sul ciclo di vita è determinare l'effetto della sostanza chimica in esame sulla riproduzione e, per le due generazioni, la velocità di sviluppo e il numero totale di moscerini maschi e femmine completamente emersi e vivi. Ai fini del calcolo del tasso di emergenza, i dati concernenti i maschi e le femmine devono essere raggruppati. Se non vi sono differenze statisticamente significative in termini di sensibilità per quanto riguarda la velocità di sviluppo dei due sessi, ai fini dell'analisi statistica i risultati ottenuti per i maschi e per le femmine possono essere raggruppati.
43. Le concentrazioni con effetto, espresse come concentrazioni nell'acqua sovrastante (per l'acqua addizionata) o nel sedimento (per il sedimento addizionato) sono solitamente calcolate sulla base delle concentrazioni misurate all'inizio dell'esposizione (cfr. paragrafo 38). Pertanto, per quanto riguarda l'acqua addizionata, per ogni trattamento si calcola la media delle concentrazioni generalmente misurate all'inizio dell'esposizione nell'acqua sovrastante dei recipienti per entrambe le generazioni e la media delle concentrazioni dei cristallizzatori. Per quanto concerne il sedimento addizionato, per ogni trattamento si calcola la media delle concentrazioni generalmente misurate all'inizio dell'esposizione nei recipienti per entrambe le generazioni (ed eventualmente la media delle concentrazioni dei cristallizzatori).
44. Per effettuare una stima puntuale, ossia una EC_x, le statistiche per recipiente e per gabbia di allevamento possono essere usate alla stregua di repliche. Quando si calcola un intervallo di confidenza per una qualsiasi EC_x, occorre tener conto della variabilità tra i recipienti oppure dimostrare che tale variabilità è di entità trascurabile. Quando il modello è adattato mediante il metodo dei minimi quadrati, è necessario trasformare le statistiche per recipiente al fine di aumentare l'omogeneità della varianza. I valori della EC_x devono però essere calcolati dopo che il risultato è stato ritrasformato nel suo valore originario (31).
45. Se l'analisi statistica mira a determinare la NOEC mediante la verifica di ipotesi, è necessario prendere in considerazione la variabilità tra i recipienti, il che è garantito dal ricorso ai metodi ANOVA (ad esempio, le procedure sperimentali dei test di Williams e di Dunnett). È opportuno utilizzare il test di Williams se si ipotizza un rapporto dose/risposta monotonic, altrimenti è appropriato il test di Dunnett. In situazioni dove non sussistono tutti i consueti presupposti per l'ANOVA (31) si possono invece utilizzare test più potenti (27).

Tasso di emergenza

46. I tassi di emergenza sono dati di tipo quantale e possono essere analizzati con il test di Cochran-Armitage applicato in modo regressivo se si ipotizza un rapporto dose/risposta monotonic e i tassi di emergenza corroborano questa ipotesi. In caso contrario, si può utilizzare un test esatto di Fisher o un test di Mantel-Haentzel con correzione dei valori p secondo Bonferroni-Holm. Se si osserva che la variabilità tra le repliche alla stessa concentrazione è maggiore di quanto una distribuzione binomiale indicherebbe (variazione spesso denominata "extrabinomiale"), si applicherà un test più potente (Cochran-Armitage o Fisher esatto) come proposto in (27).

Si determina la somma dei moscerini vivi (maschi e femmine) emersi per recipiente (n_e) e la si divide per il numero di larve introdotte (n_a):

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

dove:

ER = tasso di emergenza

n_e = numero di moscerini vivi emersi per recipiente

n_a = numero di larve introdotte per recipiente (normalmente 20)

Se n_e è superiore a n_a (ossia se si introduce involontariamente un numero di larve superiore a quello previsto), è necessario aumentare il valore di n_a affinché sia uguale a n_e .

- 47. Un approccio alternativo più adatto ai campioni di grandi dimensioni, in presenza di varianza extrabinomiale, consiste nel trattare il tasso di emergenza come una risposta continua e adottare procedure in linea con i dati ER. Ai fini di questa analisi un campione è considerato di grandi dimensioni quando il numero di moscerini emersi e il numero di moscerini non emersi sono entrambi superiori a cinque per replica (recipiente).
- 48. Prima di applicare i metodi ANOVA, occorre trasformare i valori di ER con la radice quadrata dell'arcoseno oppure ricorrendo al metodo Tukey-Freeman per ottenere una distribuzione prossima a quella normale e livellare le varianze. Il test di Cochran-Armitage, il test esatto di Fisher (con correzione Bonferroni) oppure il test di Mantel-Haentzel possono essere impiegati quando si utilizzano delle frequenze assolute. La trasformazione con la radice quadrata dell'arcoseno consiste nel calcolare la funzione inversa del seno (seno⁻¹) della radice quadrata di ER.
- 49. Per i tassi di emergenza, i valori della EC_x sono calcolati con un'analisi di regressione (ad esempio con i modelli probit, logit o Weibull (28)). Se l'analisi di regressione è inconcludente (ad esempio, quando vi sono meno di due risposte parziali), si fa ricorso ad altri metodi non parametrici quali media mobile o interpolazione lineare.

Velocità di sviluppo

- 50. Il tempo medio di sviluppo è il tempo medio intercorso tra l'introduzione delle larve (giorno 0 della prova) e l'emersione della coorte sperimentale di moscerini (per calcolare il tempo reale di sviluppo si deve tenere conto dell'età delle larve al momento dell'introduzione). La velocità di sviluppo (unità: 1/giorno) è inversamente proporzionale al tempo di sviluppo e consiste nella parte di sviluppo larvale che avviene quotidianamente. Per valutare la tossicità nei sedimenti si preferisce fare riferimento alla velocità di sviluppo perché, rispetto al tempo di sviluppo, ha una varianza più bassa e valori più omogenei e più prossimi a una distribuzione normale. Per questo motivo, a differenza del tempo di sviluppo, con la velocità di sviluppo si possono applicare test parametrici più potenti. Se la velocità di sviluppo è trattata come risposta continua, i valori della EC_x possono essere stimati avvalendosi dell'analisi di regressione [ad esempio (29) (30)]. Il valore NOEC per la velocità media di sviluppo può essere determinato con i metodi ANOVA, ad esempio con il test di Williams o di Dunnett. Poiché i maschi emergono prima delle femmine, e quindi presentano una velocità di sviluppo maggiore, ha senso calcolare tale velocità separatamente per ciascun sesso, oltre che globalmente per l'insieme dei moscerini.
- 51. Per i test statistici, il numero di moscerini osservati il giorno x è considerato essere emerso a metà dell'intervallo tra il giorno x e il giorno x - 1 (l = lunghezza dell'intervallo di osservazione, di solito 1 giorno). La velocità media di sviluppo per recipiente (\bar{x}) è calcolata come segue:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i X_i}{n_e}$$

dove:

- \bar{x} : velocità media di sviluppo per recipiente
- i: indice dell'intervallo di osservazione
- m: numero massimo di intervalli di osservazione
- f_i : numero di moscerini emersi nell'intervallo di osservazione i
- n_e : numero totale di moscerini emersi alla fine della prova ($\sum f_i$)
- x_i : velocità di sviluppo dei moscerini emersi nell'intervallo i

$$x_i = 1 / \text{day}_i - \frac{l_i}{2}$$

dove:

- giorno_i: giorno dell'osservazione (contato a partire dall'introduzione delle larve)
- l_i : lunghezza dell'intervallo di osservazione i (espressa in giorni, di solito 1 giorno)

Rapporto numerico tra i sessi

52. I dati relativi al rapporto numerico tra i sessi sono dati quantali, da valutare utilizzando il test esatto di Fisher o altri metodi idonei. La specie *C. riparius* presenta un rapporto numerico naturale tra i sessi pari a 1; in altre parole, il numero di maschi è uguale a quello delle femmine. Il rapporto numerico maschi/femmine deve essere calcolato nello stesso modo per entrambe le generazioni. Poiché il numero massimo di moscerini per recipiente (ossia 20) è troppo basso per effettuare un'analisi statistica significativa, si somma il numero totale di moscerini completamente emersi e vivi di ciascun sesso in tutti i recipienti sottoposti al medesimo trattamento. Questi dati non trasformati sono confrontati con il controllo (solvente) o con i dati relativi ai controlli raggruppati in una tabella di contingenza 2×2 .

Riproduzione

53. La riproduzione, come la fecondità, è calcolata come numero di cordoni di uova per femmina. Più precisamente, il numero totale di cordoni di uova depositi in una gabbia di allevamento viene diviso per il numero totale di femmine vive e in buona salute introdotte nella gabbia. Il valore NOEC per la fecondità può essere determinato con i metodi ANOVA, ad esempio con il test di Williams o di Dunnett.
54. Il valore relativo alla fertilità dei cordoni di uova consente di quantificare il numero di cordoni di uova fertili per ciascuna femmina. Il numero totale di cordoni di uova fertili depositi in una gabbia di allevamento viene diviso per il numero totale di femmine vive e in buona salute introdotte nella gabbia. Il valore NOEC per la fertilità può essere determinato con i metodi ANOVA, ad esempio con il test di Williams o di Dunnett.

Relazione sulla prova

55. La relazione sulla prova deve comprendere le informazioni seguenti.

Sostanza chimica in esame:

- natura fisica e, se del caso, proprietà fisico-chimiche (solubilità in acqua, tensione di vapore, $\log K_{ow}$, coefficiente di ripartizione nel terreno — o nel sedimento, se noto -, stabilità nell'acqua e nel sedimento, ecc.),
- dati di identificazione chimica (nome comune, nome chimico, formula strutturale, numero CAS, ecc.), compresi purezza e metodo di analisi per la quantificazione della sostanza chimica in esame.

Specie sperimentali:

- organismi utilizzati per la prova: specie, nome scientifico, provenienza degli organismi e condizioni di allevamento,
- informazioni sulla manipolazione degli ammassi di uova e delle larve,

- informazioni sulla manipolazione degli adulti emersi della prima generazione con l'ausilio di un estrattore o di un altro dispositivo (cfr. appendice 5),
- età degli organismi al momento della loro introduzione nei recipienti di prova della prima e della seconda generazione.

Condizioni sperimentali:

- sedimento utilizzato, ossia naturale o artificiale,
- per i sedimenti naturali: ubicazione e descrizione del sito di prelievo del sedimento e, se possibile, cronistoria della contaminazione; caratteristiche del sedimento: pH, tenore di carbonio organico, rapporto C/N e granulometria (se del caso);
- per i sedimenti artificiali: preparazione, ingredienti e caratteristiche (tenore di carbonio organico, pH, umidità, ecc. misurati all'inizio della prova),
- preparazione dell'acqua (se si utilizza acqua ricostituita) e caratteristiche (concentrazione di ossigeno, pH, durezza, ecc. misurati all'inizio della prova),
- spessore del sedimento e profondità dell'acqua sovrastante nei recipienti di prova e nei cristallizzatori,
- volume dell'acqua sovrastante e dell'acqua interstiziale; peso del sedimento umido con e senza acqua interstiziale nei recipienti di prova e nei cristallizzatori,
- recipienti di prova (materiale e dimensioni),
- cristallizzatori (materiale e dimensioni),
- gabbie di allevamento (materiale e dimensioni),
- metodo di preparazione delle soluzioni madre e delle concentrazioni di prova per i recipienti di prova e i cristallizzatori;
- applicazione della sostanza chimica in esame nei recipienti di prova e nei cristallizzatori: concentrazioni di prova, numero di repliche e, se del caso, solventi;
- condizioni di incubazione per i recipienti di prova: temperatura, fotoperiodo e intensità luminosa, aerazione (bolle al secondo);
- condizioni di incubazione per le gabbie di allevamento e i cristallizzatori: temperatura, fotoperiodo e intensità;
- condizioni di incubazione per i cordoni di uova nelle piastre per microtitolazione (o in altri recipienti): temperatura, fotoperiodo e intensità luminosa;
- informazioni dettagliate sull'alimentazione, che comprendano il tipo di mangime, la preparazione, la quantità e il regime di alimentazione.

Risultati:

- concentrazioni di prova nominali, concentrazioni di prova misurate e risultati di tutte le analisi condotte per determinare la concentrazione della sostanza chimica in esame nei recipienti di prova e nei cristallizzatori,
- qualità dell'acqua nei recipienti di prova e nei cristallizzatori, ossia pH, temperatura, ossigeno dissolto, durezza e tenore di ammoniaca,
- aggiunta di acqua nei recipienti di prova per sostituire quella eventualmente evaporata;
- numero di moscerini maschi e femmine emersi, al giorno, per recipiente per la prima e la seconda generazione,
- rapporto numerico tra i sessi dei moscerini completamente emersi e vivi per trattamento per la prima e la seconda generazione,
- numero di larve non emerse come moscerini per recipiente per la prima e la seconda generazione,
- percentuale di emergenza per replica e per concentrazione di prova (risultati raggruppati per moscerini maschi e femmine) per la prima e la seconda generazione;
- velocità media di sviluppo dei moscerini completamente emersi e vivi, per replica e per concentrazione somministrata (risultati sia separati che raggruppati per moscerini maschi e femmine), per la prima e la seconda generazione;

- numero di cordoni di uova deposti ogni giorno nei cristallizzatori per gabbia di allevamento;
- caratteristiche di ciascun cordone di uova (dimensioni, forma e fertilità),
- fecondità: numero totale di cordoni di uova sul numero totale di femmine introdotte nella gabbia di allevamento,
- fertilità: numero totale di cordoni di uova fertili sul numero totale di femmine introdotte nella gabbia di allevamento,
- stime degli endpoint di tossicità, ad esempio EC_x (e relativi intervalli di confidenza) e NOEC, nonché i metodi statistici utilizzati per determinarli;
- discussione dei risultati, comprese le eventuali ripercussioni sui risultati dovute allo scostamento dal presente metodo di prova.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Capitolo C.28 del presente allegato, "Prova di tossicità su chironomidi in acqua-sedimento con acqua addizionata".
- (2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. and M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus (Camptochironomus) tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). *Entomologica Scandinavica*, 30: 311–322.
- (3) Fleming, R. et al. (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- (4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- (5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (6) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, December 1997.
- (7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second edition, EPA 600/R-99/064, March 2000, Revision to the first edition dated June 1994.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.
- (10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. and R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canada.
- (11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. and C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 2662-2674.
- (12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. e L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, *Ecotoxicology*, 16: 221-230.
- (13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*, *Jp. J. Sanit. Zool.*, 48: 345-350.
- (14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), *Jp. J. Sanit. Zool.*, 37: 47-57.
- (15) Capitolo C.27 del presente allegato, "Prova di tossicità su chironomidi in acqua-sedimento con sedimento addizionato".

- (16) OCSE (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paris.
- (17) Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, *Integr. Environ. Assess. Management*.
- (18) Environment Canada. (1995), Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant, Report EPS 1/RM/30, September 1995.
- (19) Oetken, M, Nentwig, G., Löffler, D, Ternes, T. and J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 49: 353-361.
- (20) Suedel, B.C. and J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 1163-1175.
- (21) Naylor, C. and C. Rodrigues (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, *Chemosphere*, 31: 3291-3303.
- (22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50: 1096-1121.
- (23) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, 20: 482-491.
- (24) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103-117.
- (25) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 510-531.
- (26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. and H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. *J Soils Sediments*, 9: 94-102.
- (27) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics*, 48: 577-585.
- (28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, *Water Res.*, 18: 213-221.
- (29) Bruce, R.D. e D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environ. Toxicol. Chem.*, 11: 1485-1494.
- (30) Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66: 298-312.
- (31) OCSE (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidanceto Application*, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, 146 pp., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.
- (32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. and G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1165-1176.
- (33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. and J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) — baseline experiments for future multi-generation studies, *J. Environ. Sci. Health Part A*, 42: 1-9.
- (34) OCSE (2010), *Validation report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.

Appendice 1

Definizioni

Ai fini del presente metodo di prova si applicano le seguenti definizioni:

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

Sedimento artificiale: miscela di materiali usati per simulare i componenti fisici di un sedimento naturale.

Acqua sovrastante: acqua al di sopra del sedimento nel recipiente di prova.

Acqua interstiziale: acqua che occupa lo spazio tra il sedimento e le particelle di terreno.

Acqua addizionata: acqua utilizzata per la prova alla quale è stata aggiunta la sostanza chimica in esame.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata seguendo il presente metodo di prova.

Appendice 2

Indicazioni per l'allevamento di *Chironomus riparius*

1. Le larve di *Chironomus* possono essere allevate in cristallizzatori o in grandi recipienti. Il fondo del recipiente è ricoperto di un sottile strato di sabbia di quarzo dello spessore di circa 5-10 mm. Anche il Kieselgur (ad esempio l'articolo 8117 di Merck) ha dato prova di essere un substrato idoneo (nel qual caso basta uno strato ancora più sottile di pochi millimetri). Si aggiunge acqua di qualità adeguata a un'altezza di vari centimetri, avendo cura di mantenere questo livello iniziale rabboccando acqua in caso di evaporazione per prevenire il disseccamento. L'acqua può essere rinnovata completamente, se necessario. Fornire un'aerazione moderata. I recipienti di allevamento delle larve devono essere situati in apposite gabbie per impedire la fuga degli adulti via via che emergono. La gabbia deve essere abbastanza grande da consentire agli adulti emersi di sfarfallare, condizione imprescindibile per la copulazione (dimensioni minime: circa 30 × 30 × 30 cm).
2. Le gabbie devono essere tenute a temperatura ambiente, oppure a una temperatura costante di 20 ± 2 °C, con un fotoperiodo di 16 ore di luce (a un'intensità luminosa di circa 1 000 lux) e 8 ore di buio. Da alcuni studi si è appreso che un'umidità dell'aria inferiore al 60 % può impedire la riproduzione.

Acqua di diluizione

3. Può essere utilizzata qualsiasi acqua naturale o sintetica di qualità adeguata. Di solito si impiega acqua di pozzo, acqua di rubinetto non clorata e mezzi artificiali (come Elenkt "M4" o "M7", si veda di seguito). L'acqua deve essere aerata prima dell'uso. Se necessario, si può rinnovare l'acqua di coltura versando o sifonando l'acqua usata dai recipienti facendo attenzione a non distruggere i tubi delle larve.

Alimentazione delle larve

4. Le larve di *Chironomus* sono nutriti con mangime per pesci in fiocchi (Tetra Min®, Tetra Phyll® o altra marca registrata equivalente), in dose giornaliera di circa 250 mg per recipiente. Il mangime può essere somministrato sotto forma di polvere macinata secca o in sospensione acquosa: aggiungere 1,0 g di fiocchi a 20 ml di acqua di diluizione e agitare la miscela per renderla omogenea. La dieta a base di questo preparato consiste in 5 ml al giorno per recipiente (agitare prima dell'uso). La dose può essere più abbondante per le larve più vecchie.
5. L'alimentazione è adattata in funzione della qualità dell'acqua. Se il mezzo di coltura diventa torbido, occorre somministrare meno mangime. Le quantità di mangime introdotte nei recipienti vanno controllate scrupolosamente: se scarse faranno migrare le larve verso la colonna d'acqua, se in eccesso intensificheranno l'attività microbica e abbassерanno la concentrazione di ossigeno. La conseguenza, in entrambi i casi, potrebbe essere l'inibizione della crescita degli organismi.
6. Nell'allestire nuovi recipienti di coltura è possibile aggiungere anche alcune cellule di alghe verdi (come *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

Alimentazione degli adulti emersi

7. Alcuni ricercatori suggeriscono, come mezzo di alimentazione per gli adulti emersi, un tampone di ovatta imbevuto di una soluzione satura di saccarosio.

Emergenza

8. Alla temperatura di 20 ± 2 °C gli adulti iniziano ad emergere dai recipienti di allevamento delle larve dopo circa 13-15 giorni. I maschi si distinguono facilmente perché dotati di antenne piumate e di una struttura corporea esile.

Ammassi di uova

9. Dal momento in cui si osserva la presenza di adulti nelle gabbie di allevamento, occorre controllare tutti i recipienti di allevamento delle larve tre volte la settimana per vedere se sono state deposte le uova, sotto forma di ammassi gelatinosi. Gli ammassi di uova devono essere rimossi con cura e trasferiti in un recipiente piccolo contenente un campione dell'acqua di coltura. Essi sono utilizzati per preparare un nuovo recipiente di coltura (ad esempio, 2-4 ammassi per recipiente) oppure per eseguire prove di tossicità.
10. Le larve al primo stadio nascono di norma dopo 2-3 giorni.

Allestimento di nuovi recipienti di coltura

11. Una volta avviate le colture, dovrebbe essere possibile allestire un nuovo recipiente per la coltura di larve a cadenza settimanale o meno spesso, secondo quanto richiesto dalla prova, ritirando i recipienti vecchi dopo che i moscerini adulti sono emersi. Questo sistema permette di ottenere regolarmente una quota di adulti con un'organizzazione minima.

Preparazione delle soluzioni di prova M4 e M7

12. Il mezzo M4 è stato descritto da Elendt (1990). Il mezzo M7 è preparato come l'M4 tranne per le sostanze indicate nella tabella 1, le cui concentrazioni sono quattro volte inferiori rispetto al mezzo M4. La soluzione di prova non deve essere preparata secondo le istruzioni di Elendt e Bias (1990), perché le concentrazioni di $\text{NaSiO}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 e K_2HPO_4 indicate per la preparazione delle soluzioni madre non sono adatte.

Preparazione del mezzo M7

13. Ogni soluzione madre (I) è preparata separatamente e a partire da ciascuna di esse (I) si prepara la soluzione madre combinata (II) (cfr. tabella 1). Per preparare il mezzo M7, mescolare 50 ml di soluzione madre combinata (II) con i quantitativi di ogni soluzione madre con macronutrienti indicati nella tabella 2 e portare a 1 litro aggiungendo acqua deionizzata. Per preparare una soluzione madre vitaminica, aggiungere tre vitamine ad acqua deionizzata, come indicato nella tabella 3, e versare 0,1 ml della soluzione madre vitaminica combinata nel mezzo M7 finale poco prima dell'uso. La soluzione madre vitaminica è conservata in congelatore in piccole aliquote. Aerare e stabilizzare il mezzo.

Tabella 1

Soluzioni madre di oligoelementi per i mezzi M4 e M7

Soluzioni madre (I)	Quantità (mg) per formare una soluzione di 1 litro con acqua deionizzata	Preparazione della soluzione madre combinata (II): mescolare le quantità seguenti (ml) di soluzioni madre (I) e portare a 1 litro aggiungendo acqua deionizzata		Concentrazioni finali nelle soluzioni di prova (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (¹)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (¹)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (¹)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (¹)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$\text{SrCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (¹)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (¹)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (¹)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (¹)	335	1,0	0,25	0,017	0,004

Soluzioni madre (l)	Quantità (mg) per formare una soluzione di 1 litro con acqua deionizzata	Preparazione della soluzione madre combinata (ll): mescolare le quantità seguenti (ml) di soluzioni madre (l) e portare a 1 litro aggiungendo acqua deionizzata		Concentrazioni finali nelle soluzioni di prova (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
ZnCl ₂	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl ₂ × 6H ₂ O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na ₂ SeO ₃	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH ₄ VO ₃	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na ₂ EDTA × 2H ₂ O (¹) (²)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO ₄ × 7H ₂ O (¹) (²)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(¹) Queste sostanze sono presenti in dosi diverse in M4 e M7, come indicato sopra.

(²) Queste soluzioni sono preparate separatamente, mescolate e messe immediatamente in autoclave.

Tabella 2

Soluzioni madre di macronutrienti per i mezzi M4 e M7

	Quantità per formare una soluzione di 1 litro con acqua deionizzata (mg)	Quantità di soluzione madre di macronutrienti aggiunta per preparare i mezzi M4 e M7 (ml/l)	Concentrazioni finali nelle soluzioni di prova M4 e M7 (mg/l)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	293 800	1,0	293,8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

Tabella 3

Soluzione madre vitaminica per i mezzi M4 e M7

Le tre soluzioni di vitamine sono mescolate in modo da formare un'unica soluzione madre vitaminica

	Quantità per formare una soluzione di 1 litro con acqua deionizzata (mg)	Quantità di soluzione madre vitaminica aggiunta per preparare i mezzi M4 e M7 (ml/l)	Concentrazioni finali nelle soluzioni di prova M4 e M7 (mg/l)
Tiamina cloridrato	750	0,1	0,075
Cianocobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Biotina	7,5	0,1	0,00075

RIFERIMENTI

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, M. Streloke and H. Köpp. Berlin.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, *Protoplasma*, 154: 25-33.

Elendt, B.P. and W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna*, *Water Research*, 24: 1157-1167.

Appendice 3

Preparazione del sedimento artificiale**COMPOSIZIONE DEL SEDIMENTO**

Il sedimento è preparato come illustrato nella tabella sottostante:

Componente	Caratteristiche	% di sedimento peso secco
Torba	Torba di sfagno, con pH il più vicino possibile a 5,5-6,0, priva di residui visibili di piante, finemente macinata (granulometria ≤ 1 mm) ed essiccata all'aria	4 - 5
Sabbia di quarzo	Granulometria: > 50 % delle particelle ha dimensioni comprese tra 50 e 200 μm	75 - 76
Argilla caolinica	Tenore di caolinite ≥ 30 %	20
Carbonio organico	Regolato aggiungendo torba e sabbia	2 ($\pm 0,5$)
Carbonato di calcio	CaCO_3 , in polvere, chimicamente puro	0,05 - 0,1
Acqua	Conduttività $\leq 10 \mu\text{S}/\text{cm}$	30 - 50

PREPARAZIONE

Far essiccare all'aria e macinare finemente la torba. Preparare una sospensione della quantità richiesta di polvere di torba in acqua deionizzata utilizzando un omogeneizzatore ad alte prestazioni. Aggiustare il pH della sospensione a $5,5 \pm 0,5$ con CaCO_3 . Tenere per almeno due giorni la sospensione a temperatura di 20 ± 2 °C, agitandola leggermente per stabilizzare il pH e favorire il costituirsi di una flora microbica stabile. Misurare nuovamente il pH, che deve essere $6,0 \pm 0,5$. Successivamente mescolare la sospensione di torba con gli altri componenti (sabbia e argilla caolinica) e con acqua deionizzata, fino ad ottenere un sedimento omogeneo con tenore in acqua pari al 30–50 % del peso secco del sedimento. Misurare ancora una volta il pH della miscela finale e aggiustare a 6,5-7,5 con CaCO_3 se necessario. Prelevare campioni del sedimento per determinare il peso secco e il tenore di carbonio organico. Prima di impiegare il sedimento artificiale in una prova di tossicità su chironomidi, si consiglia di conservarlo per sette giorni alle stesse condizioni in cui si realizzerà la prova.

CONSERVAZIONE

I componenti secchi destinati alla preparazione del sedimento artificiale possono essere conservati in luogo fresco e asciutto, a temperatura ambiente. Il sedimento artificiale (umido) non può essere conservato prima del suo impiego per la prova, ma deve essere utilizzato subito dopo il periodo di riposo di 7 giorni che ne conclude la preparazione.

RIFERIMENTI

OCSE (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. e B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludge worms (Oligochaeta) in artificial media, Ecotox. Environ. Safety, 39: 10-20.

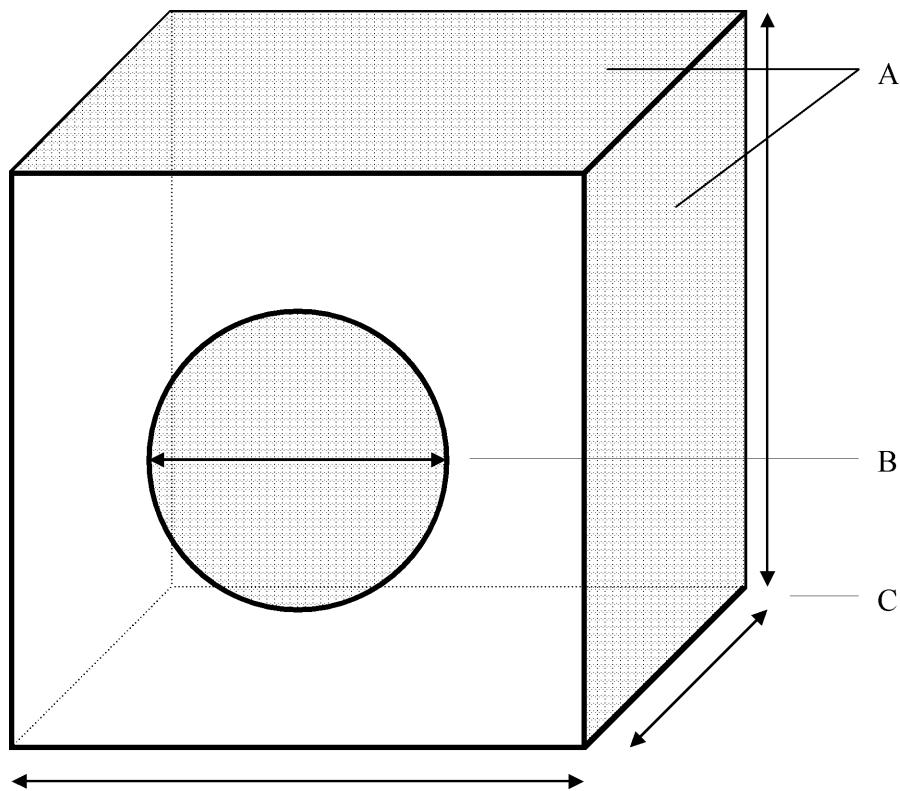
*Appendice 4***Caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione accettabile**

COMPONENTE	CONCENTRAZIONI
Particolato	< 20 mg/l
Carbonio organico totale	< 2 mg/l
Ammoniaca non ionizzata	< 1 µg/l
Durezza espressa come CaCO ₃	< 400 mg/l (*)
Cloro residuo	< 10 µg/l
Pesticidi organofosforati totali	< 50 ng/l
Pesticidi organoclorurati totali più difenili policlorurati	< 50 ng/l
Cloro organico totale	< 25 ng/l

(*) Utilizzare un'acqua meno dura se si sospetta il rischio di un'interazione tra gli ioni che provocano la durezza e la sostanza chimica in esame (nel qual caso il mezzo Elenkt M4 non può essere usato).

Appendice 5**Indicazioni sull'esecuzione della prova**

Esempio di gabbia di allevamento

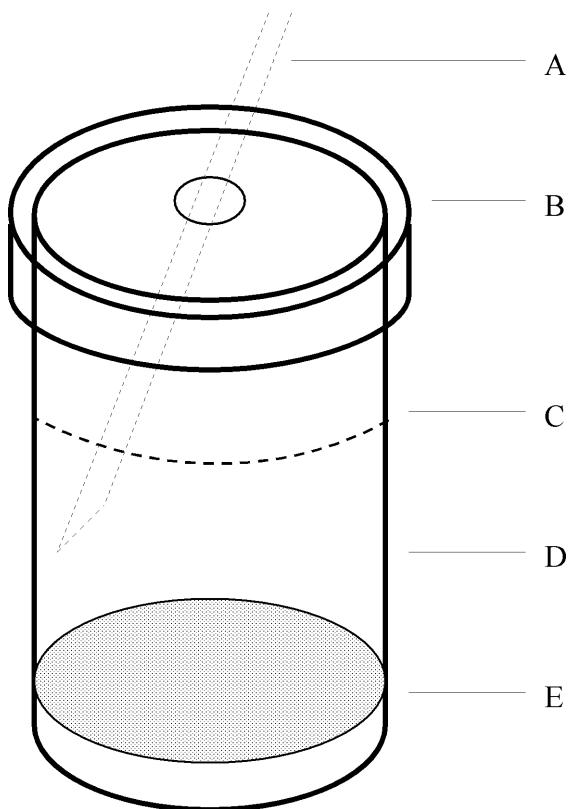


A: garza sulla parte superiore e su almeno un lato della gabbia (a maglie di circa 1 mm)

B: apertura per introdurre gli adulti emersi nella gabbia di allevamento e rimuovere dai cristallizzatori (non visibili nella figura) i cordoncini di uova depositi

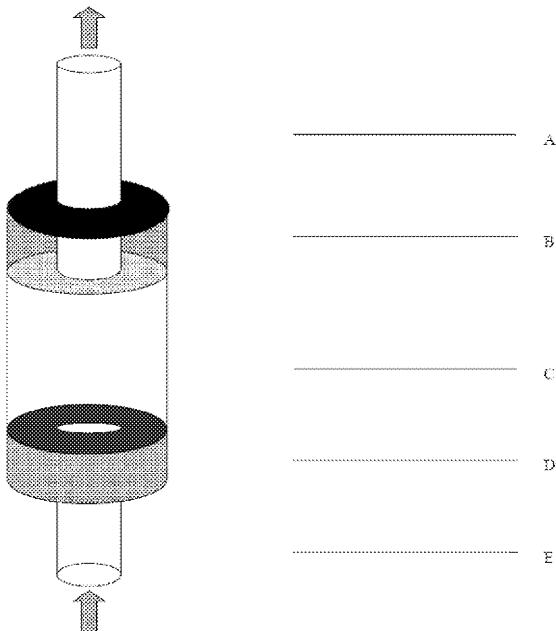
C: dimensioni minime della gabbia di allevamento: 30 cm di lunghezza, 30 cm di altezza e 30 cm di larghezza

Esempio di recipiente di prova



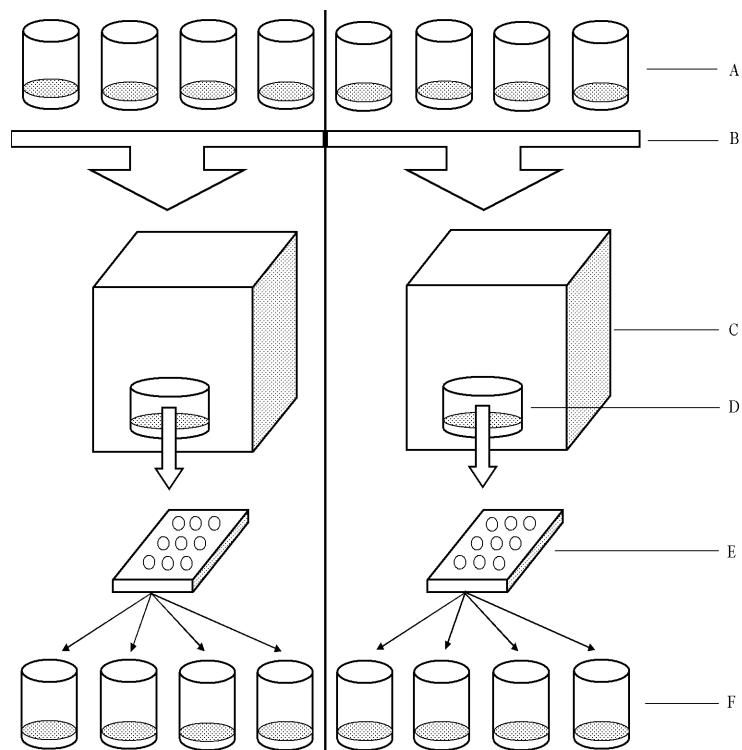
- A: pipetta Pasteur per insufflare l'aria nell'acqua sovrastante
B: coperchio di vetro per evitare che i moscerini emersi fuoriescano dal recipiente
C: livello dell'acqua
D: recipiente di prova (becher di vetro con capienza di almeno 600 ml)
E: strato di sedimento

Esempio di estrattore per la cattura dei moscerini adulti (le frecce indicano la direzione del flusso d'aria)



- A: tubo di vetro (diametro interno di circa 5 mm) collegato a una pompa autoadescente
- B: tappo di gomma vulcanizzata, perforato da un tubo di vetro (A). All'interno, l'apertura del tubo di vetro (A) è ricoperta di cotone e garza (a maglie di circa 1 mm) per evitare di danneggiare i moscerini mentre vengono aspirati nell'estrattore
- C: contenitore trasparente (di plastica o di vetro, avente una lunghezza di circa 15 cm) per i moscerini catturati
- D: tappo di gomma vulcanizzata, perforato da un tubo (E). Per liberare i moscerini nella gabbia di allevamento, estrarre il tappo D dal contenitore C
- E: tubo (di plastica o di vetro, diametro interno di circa 8 mm) per prelevare i moscerini adulti dal recipiente

Presentazione schematica di una prova sul ciclo di vita



A: prima generazione – recipienti di prova contenenti un sistema sedimento-acqua, otto repliche, 20 larve al primo stadio per recipiente

B: quattro recipienti di prova per ogni gabbia di allevamento, A e B

C: gabbie di allevamento (A e B) per lo sfarfallamento, l'accoppiamento e la deposizione delle uova

D: cristallizzatori per la deposizione dei cordoni di uova

E: piastre per microtitolazione, un pozzetto per ogni cordone di uova

F: seconda generazione – recipienti di prova contenenti un sistema sedimento-acqua, otto repliche, 20 larve al primo stadio per recipiente

C.41. PROVA SULLO SVILUPPO SESSUALE DEI PESCI

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 234 (2011). Esso si basa su una decisione del 1998 intesa a rivedere i metodi di prova esistenti, o a elaborarne di nuovi, per lo screening e la sperimentazione di potenziali interferenti endocrini. La "Prova sullo sviluppo sessuale dei pesci" si è rivelato un metodo promettente e adatto ad esaminare la fase del ciclo di vita dei pesci che risulta sensibile e ricettiva tanto alle sostanze chimiche estrogeniche quanto a quelle androgeniche. Dal 2006 al 2010 il metodo di prova è stato sottoposto ad un programma di validazione interlaboratorio, che ha permesso di validarne l'applicazione alle specie ittiche *Oryzias latipes* (medaka giapponese), *Danio rerio* (pesce zebra) e *Gasterosteus aculeatus* (spinarello), mentre la validazione per la specie *Pimephales promelas* (ciprinidi, "testa grassa") è parziale (41) (42) (43). Il presente protocollo si applica al medaka giapponese, al pesce zebra e allo spinarello. Esso costituisce, fondamentalmente, un miglioramento della linea guida dell'OCSE n. 210 "Pesci, saggio di tossicità sugli stadi di vita precoci" (1), in cui l'esposizione si protrae fino alla differenziazione sessuale dei pesci, ossia per circa 60 giorni dopo la schiusa delle uova del medaka giapponese, dello spinarello e del pesce zebra (il periodo di esposizione può essere più breve o più lungo per altre specie convalidate successivamente), con l'aggiunta di parametri da sottoporre a validazione (*endpoint*) osservabili sul sistema endocrino. La "Prova sullo sviluppo sessuale dei pesci" valuta gli effetti sui primi stadi di vita nonché le potenziali conseguenze negative delle sostanze chimiche sospette di agire da interferenti endocrini (estrogeni, androgeni e inibitori della steroidogenesi) sullo sviluppo sessuale. La combinazione dei due principali effetti osservati sul sistema endocrino — la concentrazione di vitellogenina (VTG) e il rapporto fenotipico maschi/femmine — permette alla prova di rivelare il meccanismo di azione della sostanza chimica in esame. Atteso che le modifiche del rapporto fenotipico maschi/femmine sono tipiche di una data popolazione, la "Prova sullo sviluppo sessuale dei pesci" può essere utilizzata per valutare rischi e pericoli. Tuttavia, se questo è l'obiettivo della prova, va evitato il ricorso allo spinarello poiché i dati di validazione attualmente disponibili hanno dimostrato che per tale specie le modifiche del rapporto fenotipico maschi/femmine sono atipiche.
2. Il protocollo si basa sull'esposizione di pesci a sostanze chimiche immesse nell'acqua nel periodo sessuale labile, durante il quale i pesci sono prevedibilmente più sensibili agli effetti degli interferenti endocrini che interagiscono con lo sviluppo sessuale. Due parametri principali sono misurati come indicatori delle aberrazioni dello sviluppo associate al sistema endocrino: le concentrazioni di VTG e il rapporto numerico maschi/femmine (proporzione tra i sessi) determinati mediante istologia delle gonadi. L'istopatologia delle gonadi (valutazione e classificazione in base agli stadi di ovociti e cellule spermatogenetiche) è facoltativa. Inoltre, ogni volta che sia possibile va determinato il sesso genetico (ad es. nel medaka giapponese e nello spinarello). La presenza di un marcitore genetico del sesso presenta un grande vantaggio, in quanto migliora la potenza statistica degli effetti misurati sul rapporto numerico maschi/femmine e consente di individuare l'inversione del sesso fenotipico nei singoli individui. Altri parametri apicali da misurare sono il tasso di schiusa, la sopravvivenza, la lunghezza e il peso corporeo. Il presente metodo di prova potrebbe essere adattato a specie diverse da quelle summenzionate, a condizione che le altre specie siano oggetto di una validazione equivalente a quella eseguita per il medaka giapponese, lo spinarello e il pesce zebra, i pesci di controllo siano sessualmente differenziati al termine della prova, i livelli di VTG siano sufficientemente elevati per individuare variazioni significative associate alla sostanza chimica e la sensibilità del sistema sperimentale sia stabilita utilizzando sostanze chimiche di riferimento che agiscono come interferenti endocrini [(anti)-estrogeni, (anti)-androgeni, inibitori dell'aromatasi, ecc.]. Inoltre, è necessario che le eventuali relazioni di validazione che fanno riferimento a dati della "Prova sullo sviluppo sessuale dei pesci" ma che hanno per oggetto altre specie ittiche siano riviste dall'OCSE e che il risultato della validazione sia considerato soddisfacente.

Considerazioni iniziali e limiti

3. La vitellogenina (VTG) è una proteina generalmente secreta dal fegato delle femmine di vertebrati ovipari in reazione alla circolazione di estrogeni endogeni (2). Si tratta di un precursore delle proteine del tuorlo che, una volta secreto dal fegato, è trasportato attraverso il flusso sanguigno materno nell'ovocita in crescita, in cui è incorporato e modificato. La sintesi della VTG è molto limitata, sebbene rilevabile, nei pesci immaturi e nei maschi adulti, a causa dello scarso livello di estrogeni in circolazione. Tuttavia, il fegato è in grado di sintetizzare e secretare la vitellogenina in risposta ad una stimolazione estrogenica esogena (3) (4) (5).
4. La misurazione della vitellogenina serve a individuare le sostanze chimiche che presentano meccanismi di azione estrogenica, anti-estrogenica e androgenica nonché le sostanze chimiche che interferiscono con la steroidogenesi, quali gli inibitori dell'aromatasi. L'individuazione di sostanze chimiche che hanno effetti sugli estrogeni può essere effettuata mediante la misurazione dell'induzione di vitellogenina nei pesci maschi, come documentato in numerose pubblicazioni scientifiche oggetto di valutazione *inter pares*. L'induzione di vitellogenina è stata anche dimostrata a seguito di esposizione a androgeni aromatizzabili (6) (7). Una diminuzione del livello di estrogeni in circolazione nelle femmine, ad esempio mediante l'inibizione dell'aromatasi, il complesso enzimatico che converte l'androgeno endogeno in estrogeno naturale 17 β -estradiolo, induce una diminuzione del livello di vitellogenina, che viene utilizzato per individuare le sostanze chimiche inibitorie di

aromatasi o, più in generale, gli inibitori della steroidogenesi (33). La rilevanza biologica della risposta data dalla vitellogenina a seguito dell'inibizione degli estrogeni/aromatasi è consolidata ed è stata ampiamente documentata (8) (9). Tuttavia la produzione di VTG nelle femmine può anche essere influenzata dalla tossicità generale e da meccanismi di azione tossici non-endocrini.

5. Vari metodi di misurazione sono stati sviluppati con successo e sono stati standardizzati per i test di routine intesi a quantificare la VTG nel sangue, nel fegato, nel corpo intero o nei campioni omogenati testa/coda prelevati dai singoli pesci. Le specie utilizzate a tal fine sono il danio zebroto, *Gasterosteus aculeatus* (spinarello) e *Oryrias latipes* (medaka), nonché *Pimephales promelas* (ciprinidi) parzialmente validato. Sono disponibili i metodi ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) specifici in funzione delle specie che utilizzano tecniche di immunochimica per quantificare la vitellogenina (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Nel medaka e nel danio zebroto è stata rilevata una stretta correlazione fra la concentrazione misurata nel plasma, nel fegato e nei campioni omogenati, benché questi ultimi tendano a mostrare valori leggermente inferiori a quelli relativi al plasma (17) (18) (19). Le procedure raccomandate per il campionamento ai fini dell'analisi della vitellogenina sono descritte nell'appendice 5.
6. L'evoluzione del rapporto fenotipico maschi/femmine (proporzione tra i sessi) costituisce un parametro indicatore dell'inversione di sesso. In linea di principio, gli estrogeni, gli anti-estrogeni, gli androgeni, gli anti-androgeni e gli inibitori della steroidogenesi possono incidere sul rapporto numerico maschi/femmine dei pesci in fase di sviluppo (20). È stato dimostrato che tale inversione di sesso è parzialmente reversibile nel danio zebroto(21) a seguito di esposizione a sostanze chimiche estrogeniche, mentre l'inversione di sesso a seguito di esposizione a sostanze chimiche androgeniche è permanente (30). Il sesso è determinato nei singoli pesci attraverso l'esame istologico delle gonadi ed è definito come femmina, maschio, intersessuato (ovociti e cellule spermatogeniche in un'unica gonade) o indifferenziato. Le raccomandazioni in proposito sono contenute nell'appendice 7 e nel documento di orientamento dell'OCSE Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads (22).
7. Il sesso genetico è valutato tramite marcatori genetici laddove esistono per una determinata specie di pesci. Nel medaka giapponese il gene femminile XX e il gene maschile XY possono essere individuati mediante reazione a catena della polimerasi (PCR), oppure il gene collegato a Y del settore DM (DMY) può essere analizzato (DMY negativo o positivo) come descritto nei documenti di riferimento (23) (24). Per lo spinarello esiste un equivalente metodo PCR per la determinazione del sesso genetico, descritto nell'appendice 10. Laddove il sesso genetico può essere individualmente collegato al sesso fenotipico, deve essere aumentata la potenza del test e il sesso genetico va pertanto determinato nelle specie che presentano marcatori del sesso genetico debitamente documentati.
8. La combinazione dei due principali parametri endocrini — la VTG e il rapporto numerico maschi/femmine — può dimostrare il meccanismo d'azione della sostanza chimica sul sistema endocrino (tabella 1). Dato che il rapporto numerico maschi/femmine è un biomarcitore caratteristico della popolazione (25) (26), nel caso di alcuni meccanismi d'azione ben definiti, i risultati ottenuti nella "Prova sullo sviluppo sessuale dei pesci" possono essere utilizzati ai fini della valutazione di pericoli e rischi, se ciò è ritenuto opportuno dall'agenzia di regolamentazione. Attualmente questi meccanismi di azione sono quelli degli estrogeni, androgeni e inibitori della steroidogenesi.

Tabella 1

Reazione dei parametri misurati sul sistema endocrino con differenti meccanismi di azione delle sostanze chimiche:

↑= aumento, ↓=diminuzione, — = non indagata

Meccanismo di azione	VTG ♂	VTG ♀	Rapporto numerico maschi/femmine	Riferimenti
Agonista debole degli estrogeni	↑	↑	↑♀ o ↑ indiff.	(27) (40)
Agonista forte degli estrogeni	↑	↑	↑♀ o ↑ indiff., No ♂	(28) (40)
Antagonista degli estrogeni	—	—	↓♀, ↑ indiff.	(29)
Agonista degli androgeni	↓ o —	↓ o —	↑ ♂, No ♀	(28) (30)
Antagonista degli androgeni	—	—	↑♀ ↑ intersessuato	(31)
Inibitore dell'aromatasi	↓	↓	↓♀	(33)

9. La "Prova sullo sviluppo sessuale dei pesci" non copre la fase di riproduzione dei pesci; le sostanze chimiche di cui si sospetta un effetto sulla riproduzione a concentrazioni inferiori a quelle che interferiscono con lo sviluppo sessuale devono pertanto essere valutate mediante una prova che comprenda la fase di riproduzione.
10. Le definizioni dei termini utilizzati nel presente metodo di prova figurano nell'appendice 1.
11. La "Prova sullo sviluppo sessuale dei pesci" *in vivo* mira ad individuare le sostanze chimiche con proprietà androgeniche e estrogeniche, anti-androgeniche, anti-estrogeniche e di inibitore della steroidogenesi. Le fasi di validazione (1 e 2) della prova hanno considerato sostanze chimiche estrogeniche, androgeniche e inibitorie della steroidogenesi. Gli effetti, rilevati nella prova, degli antagonisti degli estrogeni e degli androgeni sono illustrati nella tabella 1, ma questi meccanismi di azione sono attualmente meno documentati.

PRINCIPIO DELLA PROVA

12. Nel corso della prova i pesci sono esposti — a partire dall'ovulo appena fecondato fino al completamento della differenziazione sessuale — ad almeno tre concentrazioni della sostanza chimica in esame disciolta in acqua. La prova è eseguita in condizioni di flusso continuo, a meno che ciò sia impossibile a motivo, ad esempio, della disponibilità o della natura della sostanza chimica in esame (solubilità limitata, ad esempio). All'inizio della prova, gli ovuli appena fecondati (prima della divisione del blastodisco) sono collocati nelle vasche sperimentali. Il tasso di carico delle vasche è descritto al paragrafo 27 per ciascuna specie. Per le specie validate (il medaka giapponese, lo spinarello e il pesce zebra) la prova termina 60 giorni dopo la schiusa. Al completamento della prova tutti i pesci vengono soppressi in maniera non cruenta. Un campione biologico (plasma sanguigno, fegato o omogenato testa/coda) è prelevato da ogni singolo pesce per l'analisi della VTG, procedendo alla fissazione della parte residua per l'esame istologico delle gonadi volto a determinare il sesso fenotipico; l'istopatologia (classificazione in base allo stadio di maturazione delle gonadi, gravità dell'intersessualità) è facoltativa. Un campione biologico (pinna anale o dorsale) è prelevato ai fini della determinazione del sesso genetico nelle specie che presentano biomarcatori adeguati (appendici 9 e 10).
13. L'appendice 2 offre una visione d'insieme delle condizioni sperimentali specifiche applicabili alle specie convalidate: il medaka giapponese, lo spinarello e il pesce zebra.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA CHIMICA IN ESAME

14. È opportuno che siano disponibili i risultati di una prova di tossicità acuta (o un altro test di tossicità a breve termine [ad es. metodo di prova C.14 (34) e linea guida n. 210 dell'OCSE (1)], eseguita preferibilmente sulla specie selezionata per la presente prova. Ciò presuppone che siano note la solubilità in acqua e la pressione di vapore della sostanza chimica in esame e che sia disponibile un metodo analitico affidabile per la quantificazione della sostanza chimica nelle vasche sperimentali, di cui devono essere noti e documentati i dati relativi all'accuratezza e al limite di rilevamento.
15. Le informazioni utili comprendono: formula di struttura, grado di purezza, stabilità in acqua e alla luce, pK_a , P_{ow} e i risultati di un test di pronta biodegradabilità (metodo C.4) (35).

Criteri di accettazione/validità della prova:

16. Affinché i risultati della prova siano accettabili, devono essere rispettate le seguenti condizioni:
 - la concentrazione dell'ossigeno disciolto deve essere mantenuta almeno al 60 % del valore di saturazione in aria (ASV) per tutta la durata della prova;
 - la temperatura dell'acqua non deve mai — durante tutto il periodo di esposizione — discostarsi di oltre $\pm 1,5$ °C fra i diversi contenitori e deve essere mantenuta entro gli intervalli di temperatura specificati per la specie studiata (appendice 2);
 - deve essere disponibile un metodo validato di analisi della sostanza chimica di esposizione con un limite di rilevazione minimo molto inferiore alla concentrazione nominale minima e vanno raccolti i dati che dimostrino che le concentrazioni della sostanza chimica in esame in soluzione sono state adeguatamente mantenute entro ± 20 % dalla media dei valori misurati;

- la sopravvivenza complessiva delle uova fecondate nei controlli e, se del caso, nei contenitori con solo solvente, deve essere superiore o uguale ai valori definiti nell'appendice 2;
- i criteri di validità relativi alla crescita e alla proporzione tra i sessi al completamento della prova si basano sui dati dei gruppi di controllo (riunire il gruppo di controllo contenente il solvente e il gruppo di controllo con acqua, a meno che non presentino differenze significative, nel qual caso utilizzare soltanto i risultati dei controlli con solvente):

		Medaka giapponese	Danio zebrato	Spinarello
Crescita	Peso del pesce fresco, asciugato per tamponamento	>150 mg	>75 mg	> 120 mg
	Lunghezza (lunghezza standard)	>20 mm	>14 mm	>20 mm
Rapporto in % maschi/femmine		30-70 %	30-70 %	30-70 %

- l'impiego di un eventuale solvente non dovrebbe avere un effetto statisticamente significativo sulla sopravvivenza, né produrre effetti nocivi sul sistema endocrino o altri effetti negativi sui primi stadi di vita, comprovato dai risultati derivanti da un controllo con solvente.

Se si registra una deviazione rispetto ai criteri di validità della prova, le conseguenze sono analizzate in relazione all'attendibilità dei dati di prova, e tali considerazioni vanno documentate nella relazione finale.

DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

Vasche sperimentali

17. Le vasche sperimentali possono essere di vetro, acciaio inossidabile o altro materiale chimicamente inerte. Le dimensioni dei contenitori devono essere sufficientemente grandi da rispettare i criteri di carico forniti più avanti. Si raccomanda di collocare in modo casuale le vasche sperimentali nella zona della prova. Una disposizione delle vasche sperimentali secondo uno schema a blocchi, casuale, in cui ciascun blocco contenga ciascuna concentrazione, è preferibile a uno schema disposto in modo completamente casuale. Le vasche sperimentali devono essere protette da eventuali disturbi.

Selezione delle specie ittiche

18. Le Specie sperimentali raccomandate sono indicate nell'allegato 2. Le procedure per l'inclusione di nuove specie sono descritte nel paragrafo 2.

Mantenimento dei pesci riproduttori

19. Le modalità per mantenere i pesci riproduttori in condizioni soddisfacenti sono descritte nella linea guida n. 210 (1) dell'OCSE. I pesci riproduttori sono nutriti una o due volte al giorno con mangimi appropriati.

Manipolazione di embrioni e larve

20. Inizialmente, gli embrioni e le larve possono essere esposti all'interno della vasca principale in contenitori più piccoli in vetro o acciaio inossidabile, i cui lati ed estremità siano dotati di reti che consentano il flusso della soluzione chimica in esame nella vasca. Si può indurre un flusso non turbolento in questi contenitori più piccoli sospendendoli a un braccio sistemato in modo che muova il contenitore verticalmente, mantenendo però sempre sommersi gli organismi.
21. Se sono stati usati contenitori, griglie o reti per mantenere le uova all'interno della vasca principale, tali ostacoli vanno rimossi dopo la schiusa delle larve, ad eccezione delle reti che impediscono ai pesci di fuggire. Se è necessario trasferire le larve, si deve avere cura di non esporle all'aria e non si devono utilizzare retini per rilasciare i pesci dai contenitori con le uova. Il trasferimento, i cui tempi dipendono dalla specie, non è sempre necessario.

Acqua

22. Per la prova si può utilizzare qualunque tipo di acqua in cui le specie esaminate (di controllo) presentano un tasso di sopravvivenza pari o migliore di quello ottenuto nell'acqua descritta nell'appendice 3. La qualità dell'acqua dovrebbe essere costante per tutta la durata della prova. Per escludere la possibilità di effetti indesiderati dell'acqua di diluizione sui risultati della prova (ad esempio per complessazione della sostanza chimica in esame) o influenze negative sulla performance dei pesci riproduttori è utile prelevare periodicamente alcuni campioni e analizzarli. Il carbonio organico totale, la conducibilità, il pH e i solidi sospesi vanno misurati, ad esempio ogni tre mesi nel caso di un'acqua di diluizione di qualità relativamente costante. I metalli pesanti (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), i principali anioni e cationi (ad es. Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, Cl⁻, SO₄²⁻) e i pesticidi vanno misurati, se la qualità dell'acqua è discutibile. L'analisi chimica e la raccolta dell'acqua sono descritte nel paragrafo 34.

Soluzioni di prova

23. Occorre utilizzare un sistema a flusso continuo ogni volta che ciò sia possibile nella pratica. Le prove a flusso continuo comportano l'uso di un sistema che eroghi e diluisca di continuo la soluzione madre della sostanza chimica in esame (ad esempio pompa dosatrice, diluitore proporzionale, sistema di saturazione) in modo da distribuire una serie di concentrazioni nelle vasche sperimentali. Le portate di soluzione madre e acqua di diluizione dovrebbero essere controllate a intervalli, preferibilmente ogni giorno, e non presentare variazioni superiori al 10 % per tutta la durata della prova. Si considera adeguata una portata equivalente ad almeno cinque volte il volume della vasca sperimentale ogni 24 ore (1). Si deve prestare attenzione ad evitare l'utilizzo di tubi in plastica o altri tipi di materiale che possano contenere sostanze chimiche biologicamente attive o adsorbire la sostanza chimica in esame.
24. La soluzione madre deve essere preparata preferibilmente senza l'uso di solventi, semplicemente miscelando o agitando la sostanza chimica in esame nell'acqua di diluizione con mezzi meccanici (mescolamento o ultrasuoni). Se una sostanza chimica in esame è difficile da sciogliere in acqua, vanno applicate le procedure descritte nel documento di orientamento dell'OCSE *Guidance document on Aquatic Toxicity Testing of substances and mixtures difficult* (36). In alcuni casi può rendersi necessario l'uso di solventi o disperdenti per ottenere una soluzione madre di adeguata concentrazione. Il documento (36) fornisce esempi di idonei solventi.
25. Sono da evitare le condizioni di prova semistatiche a meno che ciò sia giustificato da motivi imperativi connessi con la sostanza chimica in esame (stabilità, disponibilità in quantità limitata, costo o rischio elevato, ad esempio). Per la tecnica semistatica si possono usare due diverse procedure di rinnovo: si preparano nuove soluzioni di prova in recipienti puliti e si trasferiscono delicatamente le uova e le larve sopravvissute nei nuovi recipienti oppure si mantengono gli organismi sperimentali nelle vasche sperimentali avendo cura di cambiare quotidianamente una parte (almeno due terzi) dell'acqua di prova.

PROCEDIMENTO

Condizioni di esposizione

Raccolta delle uova e durata

26. Per evitare errori genetici, le uova sono raccolte a partire da almeno tre coppie o gruppi riproduttori, mescolati e selezionati in modo casuale per avviare la prova. Per lo spinarello, si rimanda alla descrizione della procedura di fecondazione artificiale riportata nell'appendice 11. La prova inizia non appena possibile dopo la fecondazione delle uova; gli embrioni sono preferibilmente immersi nella soluzione di prova prima che inizi la divisione del blastodisco o quanto più vicino possibile dopo tale fase ma non oltre 12 ore dalla fecondazione. La prova continua fino al completamento della differenziazione sessuale nel gruppo di controllo (60 giorni dopo la schiusa per il medaka giapponese, lo spinarello e il pesce zebra).

Carico

27. La prova inizia con almeno 120 uova fecondate per concentrazione, distribuite tra almeno quattro repliche (è accettata la ripartizione per radice quadrata nel campione di controllo). Le uova sono distribuite in modo casuale (secondo le tabelle statistiche di randomizzazione) tra i diversi livelli di esposizione. È opportuno che il tasso di carico (cfr. l'appendice 1 per la definizione) sia sufficientemente basso da consentire che la concentrazione di ossigeno dissolto rimanga ad almeno il 60 % del valore di saturazione nell'aria senza aerazione diretta. Per la prova a flusso continuo è stato raccomandato un regime di carico non superiore a 0,5 g/l per 24 ore e non superiore a 5 g/l di soluzione in qualsiasi momento. Al più tardi 28 giorni dopo la fecondazione il numero di pesci per replica è ridistribuito in modo che ogni replica contenga — per quanto possibile — un numero uguale di pesci. In caso di mortalità dovuta all'esposizione, il numero di repliche è debitamente ridotto, in modo che la densità dei pesci tra i livelli di trattamento sia mantenuta omogenea per quanto possibile.

Illuminazione e temperatura

28. Il fotoperiodo e la temperatura dell'acqua devono essere adeguati alla specie utilizzata (cfr. le condizioni sperimentali nell'appendice 2).

Alimentazione

29. La dieta e l'alimentazione sono aspetti critici; è essenziale fornire un'alimentazione adeguata a ciascuna fase di sviluppo, ad intervalli di tempo definiti e in quantità sufficienti per assicurare la crescita normale. L'alimentazione è fornita *ad libitum* minimizzando l'eccedenza. Affinché il tasso di crescita sia sufficiente, i pesci sono alimentati almeno due volte al giorno (eventualmente una volta al giorno durante il fine settimana), con un intervallo di almeno tre ore dopo ogni pasto. Il cibo in eccesso e gli escrementi sono eliminati, come necessario, per evitare l'accumulo di rifiuti. Man mano che si acquisisce esperienza, il cibo e i regimi alimentari saranno costantemente affinati per migliorare il tasso di sopravvivenza e ottimizzare la crescita. È pertanto necessario cercare ogni possibile conferma al regime alimentare proposto da parte di esperti riconosciuti. L'alimentazione dei pesci è sospesa 24 ore prima dell'inizio della prova. L'appendice 2 riporta alcuni esempi di regimi alimentari adeguati (cfr. anche il documento dell'OCSE Fish Toxicity Testing Framework (39)).

Concentrazioni della sostanza chimica in esame

30. Le concentrazioni delle sostanze chimiche in esame sono distribuite come descritto nell'appendice 4. Vanno utilizzate almeno tre concentrazioni della sostanza chimica in esame in almeno quattro repliche. Nella scelta dell'intervallo delle concentrazioni bisogna tenere conto della curva che correla la LC₅₀ al periodo di esposizione nello studio della tossicità acuta. Si raccomanda l'uso di cinque concentrazioni sperimentali se i dati saranno utilizzati ai fini della valutazione dei rischi.
31. Non è necessario testare concentrazioni della sostanza chimica superiori al 10 % della LC₅₀ acuta per gli adulti o a 10 mg/l, qualsiasi sia la più bassa. È opportuno che la concentrazione massima sia pari al 10 % della LC₅₀ per gli stadi di larva e di esemplare giovane.

Controlli

32. Un controllo con l'acqua di diluizione (≥ 4 repliche) e, se del caso, un controllo con acqua contenente il solvente (≥ 4 repliche) sono inclusi nella prova in aggiunta alle concentrazioni della sostanza chimica in esame. Ai fini della prova vanno utilizzati soltanto solventi per i quali è stato verificato che non hanno alcuna incidenza statisticamente significativa sui parametri di valutazione (*endpoint*) della prova.
33. Se si utilizza un solvente, la sua concentrazione finale non deve superare 0,1 ml/l (36) e deve essere identica in tutte le vasche sperimentali, salvo il campione di controllo con acqua di diluizione. Tuttavia, occorre evitare, per quanto possibile, l'uso di un solvente, oppure avere cura di mantenere al minimo la concentrazione del solvente.

Frequenza delle determinazioni e delle misurazioni analitiche

34. L'analisi chimica della concentrazione della sostanza chimica in esame va effettuata prima dell'inizio della prova in modo da verificare il rispetto dei criteri di validità. Tutte le repliche sono analizzate una per una all'inizio e alla fine della prova. Una replica per concentrazione deve essere analizzata almeno una volta alla settimana durante la prova, con rotazione sistematica delle repliche (1, 2, 3, 4, 1, 2...). Se i campioni sono conservati in vista di un'analisi successiva, è opportuno che il metodo di conservazione dei campioni sia stato validato a monte. Per garantire che le determinazioni della sostanza chimica avvengano nell'effettiva soluzione della stessa, i campioni vengono filtrati (utilizzando ad esempio filtri con pori di dimensione di 0,45 µm) o centrifugati.
35. Durante la prova, vanno misurati l'ossigeno disciolto, il pH, la conduttività, la durezza totale e la salinità (se del caso) e la temperatura in tutte le vasche sperimentali. L'ossigeno disciolto, la salinità (se del caso) e la temperatura devono essere misurati almeno una volta alla settimana; il pH, la conduttività, la durezza devono essere misurati almeno all'inizio e alla fine della prova. È auspicabile che la temperatura sia controllata in maniera continua in almeno una vasca sperimentale.
36. I risultati sono basati sulle concentrazioni misurate. Tuttavia, se la concentrazione della sostanza chimica in esame in soluzione è stata adeguatamente mantenuta nel corso dell'intera prova entro un intervallo $\pm 20\%$ della concentrazione nominale, i risultati possono essere calcolati tanto a partire dai valori nominali che da quelli misurati.

Osservazioni e misurazioni

Stadio dello sviluppo embrionale

37. L'esposizione ha inizio non appena possibile dopo la fecondazione e prima dell'inizio della divisione del blastodisco e non oltre 12 ore dalla fecondazione per garantire l'esposizione fin dalla fase di sviluppo embrionale.

Schiusa e sopravvivenza

38. Almeno una volta al giorno occorre effettuare osservazioni della schiusa e della sopravvivenza e registrarne i dati. Gli embrioni, le larve e i giovani morti vanno rimossi appena individuati in quanto possono decomporsi rapidamente ed essere distrutti dall'azione degli altri pesci. Nel rimuovere gli individui morti è necessario procedere con estrema cautela per non urtare o danneggiare le uova/larve vicine, che sono estremamente delicate e sensibili. I criteri per stabilire la morte variano a seconda dello stadio di vita:

- per le uova: soprattutto nei primi stadi, marcata perdita di traslucidità e cambiamento di colorazione dovuti a coagulazione e/o precipitazione delle proteine, con conseguente aspetto bianco opaco,
- per le larve e gli esemplari giovani: immobilità e/o assenza di movimenti respiratori e/o assenza di battito cardiaco e/o colorazione bianca opaca del sistema nervoso centrale e/o mancanza di reazione agli stimoli meccanici.

Anomalie dell'aspetto

39. Va annotato il numero di larve o di pesci che presentano anomalie morfologiche, descrivendone l'apparenza e la natura. Va osservato che la presenza di embrioni e larve anomali è un fenomeno naturale e nel/i controllo/i di alcune specie può raggiungere molti punti percentuali. Gli individui che presentano anomalie vanno rimossi dai recipienti solo dopo la loro morte. Tuttavia, conformemente alla direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici, se le anomalie comportano una sofferenza grave e continuata e sia prevedibile la morte, gli animali sono anestetizzati e soppressi secondo il metodo descritto al paragrafo 44 e contabilizzati come decessi ai fini dell'analisi dei dati.

Anomalie del comportamento

40. Se osservate, vanno registrate le anomalie quali iperventilazione, natazione scoordinata, inattività anomala e un comportamento alimentare atipico.

Peso

41. Alla fine della prova tutti i pesci sopravvissuti devono essere soppressi con metodi non cruenti (anestetizzati se devono essere effettuati prelievi sanguigni) e va misurato il peso di ciascun pesce (asciugato per tamponamento).

Lunghezza

42. Alla fine della prova si raccomanda di misurare la lunghezza degli individui (lunghezza standard).
43. Tali osservazioni consentiranno di disporre, in tutto o in parte, dei seguenti dati per la relazione sulla prova:
 - mortalità cumulativa;
 - numero di pesci sani al termine della prova;
 - tempo di inizio e di fine della schiusa;
 - lunghezza e peso degli animali superstiti;
 - numero di larve deformi;
 - numero di pesci che presentano un comportamento anomalo.

Campionamento dei pesci

44. Il campionamento dei pesci è effettuato al termine della prova. I pesci campionati vengono soppressi con, ad esempio, MS-222 (100-500 mg/l tamponati con 200 mg/l di NaHCO₃) o con FA-100 (4-allil- 2-metossifenolo: eugenolo); sono misurati la lunghezza e il peso a umido (asciugatura per tamponamento) di ciascun individuo; se deve essere effettuato un prelievo di sangue, i pesci vanno anestetizzati (cfr. paragrafo 49).

Campionamento per l'analisi della VTG e la determinazione del sesso mediante valutazione istologica

45. Il campionamento è effettuato su tutti i pesci, che sono preparati per l'analisi del sesso e della VTG. Tutti i pesci sono sottoposti ad esame istologico volto a determinarne il sesso. Per le misurazioni della VTG, è accettato un sottocampione di almeno 16 pesci da ciascuna replica. L'analisi della VTG è effettuata su un maggior numero di pesci, se i risultati del sottocampione si rivelano poco chiari.
46. La procedura di campionamento per la determinazione della VTG e del sesso dipende dal metodo d'analisi della VTG:

Metodo dell'omogenato testa/coda per l'analisi della VTG

47. Il pesce è soppresso con metodo non cruento. La testa e la coda di ciascun pesce sono separate dal resto del corpo mediante recisioni effettuate col bisturi dietro le pinne pettorali e dietro la pinna dorsale (figura 1). La testa e la coda di ciascun pesce sono raggruppate, pesate e numerate, congelate in azoto liquido e conservate ad una temperatura pari o inferiore a -70 °C per l'analisi della VTG. Il resto del corpo è numerato e sottoposto a fissazione mediante adeguata soluzione fissativa in attesa della valutazione istologica (22). Questo metodo consente di valutare la VTG e l'istopatologia di ciascun individuo e un'eventuale variazione nel livello di VTG può in tal modo essere correlata al sesso fenotipico del pesce o al sesso genetico (per il medaka giapponese e lo spinarello). Per maggiori informazioni si rimanda agli Orientamenti per l'omogeneizzazione (appendice 5) e agli Orientamenti per la quantificazione della VTG (appendice 6).

Metodo dell'omogenato epatico per l'analisi della VTG

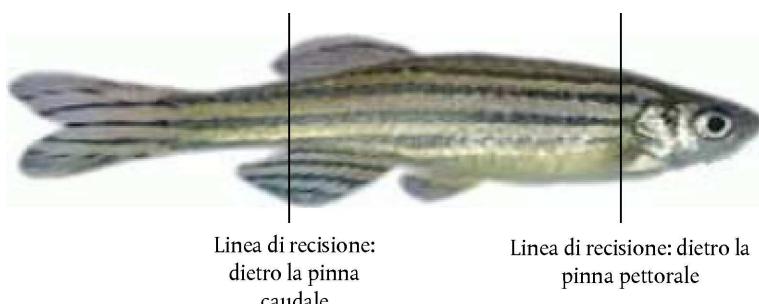
48. Il pesce è soppresso con metodo non cruento. Il fegato è estratto mediante dissezione e conservato a una temperatura pari o inferiore a -70 °C. Le procedure raccomandate per l'escissione del fegato e il pretrattamento figurano nella linea guida n. 229 dell' OCSE (37) o nel capitolo C. 37 del presente allegato (38). Ciascun fegato è omogeneizzato separatamente come descritto linea guida n. 229 dell' OCSE o nel capitolo C.37 del presente allegato. Il supernatante raccolto viene utilizzato per misurare la VTG mediante tecnica ELISA omologa [cfr. l'appendice 6 per un esempio di quantificazione del pesce zebra o la linea guida dell'OCSE n. 229 (37) per il medaka giapponese]. Seguendo tale approccio, è anche possibile ottenere dati sulla VTG e l'istologia delle gonadi dei singoli pesci.

Metodo del plasma sanguigno per l'analisi della VTG

49. I prelievi sanguigni sui pesci anestetizzati sono effettuati mediante puntura cardiaca, dalla vena caudale o da sezionamento della coda, e sono centrifugati a una temperatura di 4 °C per la raccolta del plasma. Il plasma è conservato a una temperatura pari o inferiore a -70 °C fino all'utilizzo. Il pesce è soppresso e sottoposto a fissazione in attesa dell'esame istologico. I campioni di plasma e i pesci sono numerati singolarmente al fine di correlare i livelli di VTG al sesso dei pesci.

Figura 1

Linee di recisione del pesce per la misurazione della VTG in un omogenato testa/coda e per la valutazione istologica della sezione mediana.



Determinazione del sesso genetico

50. Un prelievo biologico ai fini della determinazione del sesso genetico è effettuato su ogni singolo pesce appartenente ad una delle specie che presentano i biomarcatori adeguati. Per il medaka giapponese, sono raccolte la pinna anale o la pinna dorsale. Il prelievo dei tessuti e la determinazione del sesso mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) sono contenute nell'appendice 9. Analogamente, per lo spinarello, una descrizione della procedura di campionamento nonché del metodo PCR per la determinazione del sesso genetico è fornita nell'appendice 10.

Misurazione della VTG

51. La misurazione della VTG va effettuata sulla base di un metodo quantitativo validato. È opportuno disporre di informazioni sulla variabilità intra- e inter-prova della metodologia utilizzata in un determinato laboratorio. La fonte di variabilità inter- e intra-laboratorio dipende (probabilmente) dei diversi stadi di sviluppo delle popolazioni ittiche. Data la variabilità della misurazione della VTG, i valori NOEC basati su questo endpoint devono essere trattati con estrema cautela. Sono disponibili diversi metodi che permettono di valutare la produzione della VTG nelle specie ittiche oggetto della presente prova. Il metodo ELISA (tecnicina di immunoassorbimento enzimatico) costituisce un metodo di misurazione delle concentrazioni proteiche che è al contempo relativamente sensibile e adatto alle specie in esame. Vanno utilizzati anticorpi omologhi (della VTG della stessa specie) e, soprattutto, standard omologhi.

Determinazione del sesso

52. A seconda della procedura di campionamento della VTG, il corpo intero o la parte centrale rimanente di ogni pesce è inserito in una cassetta di trattamento pre-etichettata e fissato in un'idonea soluzione di fissaggio in vista della determinazione istologica del sesso (ed anche, in via facoltativa, della classificazione di maturazione delle gonadi). L'appendice 7 e nel documento di orientamento dell'OCSE *Diagnosis of endocrine-related Histopathology of Fish gonads* (22) fornisce indicazioni in merito. Al termine del trattamento, i pesci sono inseriti in un blocchetto di paraffina. I singoli esemplari vanno inseriti nel blocchetto lungo l'asse longitudinale. Da ciascun esemplare si tagliano almeno sei sezioni longitudinali (3-5 µm di spessore), con un piano frontale che include il tessuto gonadico di entrambe le gonadi. L'intervallo fra queste sezioni è di 50 µm circa per i maschi e di circa 250 µm per le femmine. Tuttavia, poiché ogni blocchetto conterrà spesso sia maschi che femmine (se più di un individuo è incluso in ogni blocchetto), l'intervallo tra le sezioni di questi blocchi dovrebbe essere di circa 50 µm fino a che si ottengano almeno 6 sezioni delle gonadi di ciascun maschio. Successivamente, l'intervallo tra le sezioni può essere aumentato fino a 250 µm circa per le femmine. Le sezioni sono sottoposte a un processo di colorazione con ematossilina ed eosina e poi esaminate al microscopio ottico; l'osservazione verte in particolare sul sesso (maschio, femmina, intersessuale o indifferenziato). L'intersessualità è definita dalla presenza di più di un ovocita nei testicoli per gruppo di 6 sezioni analizzate o dalla presenza (sì/no) di cellule spermatogeniche nelle ovaie. L'istopatologia e la classificazione secondo la fase di maturazione delle ovaie e dei testicoli sono facoltativi, ma, se indagate, i risultati devono formare oggetto di analisi statistica e di una relazione. Giova notare che alcune specie ittiche non possiedono allo stato naturale una coppia di gonadi completamente sviluppata e che può essere presente una sola gonade (ad es. nel medaka giapponese e talvolta nel pesce zebra). Tutte queste osservazioni vanno registrate per iscritto.
53. Nel medaka giapponese, il sesso genetico è determinato in funzione della presenza o dell'assenza del gene che determina il sesso maschile dei medaka (DMY), situato nel cromosoma Y. Il sesso in base al genotipo del medaka può essere identificato mediante sequenziamento del DMY dal DNA estratto, ad esempio, da un pezzo di pinna anale o dorsale. La presenza del DMY indica che si tratta di un individuo di sesso maschile (XY) indipendentemente dal fenotipo, mentre l'assenza di DMY indica che si tratta di un individuo di sesso femminile (XX) indipendentemente dal fenotipo (23). L'appendice 9 contiene raccomandazioni sulla preparazione dei tessuti e la PCR. La determinazione del sesso genetico di ciascuno spinarello è effettuata mediante procedura PCR, come descritta nell'appendice 10.
54. Vanno registrati i casi di intersessualità (cfr. definizioni nell'appendice 1).

Caratteri sessuali secondari

55. Nelle specie quali il medaka giapponese, i caratteri sessuali secondari sono controllati dal sistema endocrino; pertanto vanno effettuate, ove possibile, osservazioni relative alle caratteristiche fisiche dei pesci alla fine dell'esposizione. Nel medaka giapponese, la formazione dei tubercoli papillari sulla parte posteriore della pinna anale nelle femmine è sensibile agli androgeni. Il capitolo C.37 del presente allegato (38) fornisce immagini pertinenti dei caratteri sessuali secondari androgenizzati di maschi e femmine.

DATI E RELAZIONE**Trattamento dei risultati**

56. È importante utilizzare l'analisi statistica più valida per determinare i parametri in esame (*endpoint*). L'unità sperimentale è la replica, ma la variabilità intra-repliche va presa in considerazione all'atto dell'analisi statistica. Il diagramma decisionale dell'appendice 8 aiuta a scegliere l'analisi statistica più adeguata in funzione delle caratteristiche dei risultati della prova. Il livello di significatività statistica è di 0,05 per tutti gli endpoint.

Proporzioni tra i sessi e sessi genetici

57. Le proporzioni tra i sessi devono essere analizzate per valutare l'effetto significativo (NOEL/LOEC) dell'esposizione mediante il test di Jonckheere-Terpstra (*trend test*) se la relazione dose-risposta è monotona. In caso contrario va effettuato un confronto a coppie (*pairwise test*): si usi il test di Dunnett quando si possono ottenere normalità e varianza omogenea oppure il test di Tamhane-Dunnett in caso di varianza eterogenea. In caso contrario, si applicherà il test esatto di Mann-Whitney con correzione di Bonferroni-Holm. Un diagramma decisionale che descrive la statistica delle proporzioni tra i sessi figura nell'appendice 8. Le proporzioni di sesso sono presentate sotto forma di tabelle indicanti le percentuali di concentrazione \pm la deviazione standard di maschi, femmine, intersessuati e indifferenziati. Occorre mettere in evidenza la significatività statistica. Alcuni esempi sono forniti nella relazione di convalida della fase 2 della Prova sullo sviluppo sessuale dei pesci (42). Il sesso genetico va registrato sotto forma di percentuale di inversione del sesso fenotipico di maschi, femmine, intersessuati e indifferenziati.

Concentrazioni di VTG

58. Le concentrazioni di VTG devono essere analizzate per valutare l'effetto significativo (NOEL/LOEC) dell'esposizione. Il test di Dunnett è preferibile al test t con correzione di Bonferroni. Se si applica una correzione di Bonferroni, è preferibile la correzione di Bonferroni-Holm. È opportuno ammettere una trasformazione logaritmica della VTG per conseguire la normalità e una varianza omogenea. Inoltre, se la relazione dose-risposta è monotona, è preferibile il test di Jonckheere-Terpstra a quelli summenzionati. Se si utilizza il test t, o il test di Dunnett, non è necessario utilizzare un test F significativo dell'analisi della varianza (ANOVA) per proseguire. Si rimanda al diagramma decisionale dell'appendice 8 per ulteriori dettagli. Le proporzioni tra i sessi sono presentate in tabelle sotto forma di concentrazione media \pm la deviazione standard di maschi, femmine, intersessuati e indifferenziati, riportati separatamente. Occorre evidenziare la significatività statistica per le femmine fenotipiche e per i maschi fenotipici. Alcuni esempi sono forniti nella relazione di validazione della fase 2 della Prova sullo sviluppo sessuale dei pesci (42).

Concentrazioni reali della sostanza chimica in esame

59. La frequenza di analisi delle concentrazioni effettive della sostanza chimica in esame nelle vasche è indicata al paragrafo 34. I risultati sono riportati in tabelle sotto forma di concentrazione media \pm deviazione standard sulla base delle repliche, nonché della concentrazione, fornendo informazioni sul numero di campioni e indicando i valori aberranti rispetto alla concentrazione media di trattamento \pm 20 %. Alcuni esempi sono forniti nella relazione di validazione della fase 2 della Prova sullo sviluppo sessuale dei pesci (42).

Interpretazione dei risultati

60. I risultati vanno interpretati con cautela nel caso in cui le concentrazioni della sostanza chimica in esame, misurate nelle soluzioni di prova, si avvicinino a livelli prossimi al limite di rilevabilità del metodo analitico.

Relazione sulla prova

61. La relazione sulla prova deve comprendere le informazioni seguenti.

Sostanza chimica in esame

- Proprietà fisico-chimiche pertinenti; individuazione chimica, compresi la purezza e il metodo analitico per la quantificazione della sostanza chimica in esame.

Condizioni di prova

- procedura di prova usata (per esempio a flusso continuo o semistatica), disegno della sperimentazione, comprendente le concentrazioni della sostanza chimica in esame e il metodo di preparazione delle soluzioni madre (in un allegato), la frequenza del ricambio (se si usa un solvente, indicare l'agente solubilizzante e la relativa concentrazione).
- Concentrazioni nominali della sostanza chimica in esame, medie dei valori misurati e loro deviazioni standard, nelle vasche sperimentali e metodo con cui sono ottenuti (il metodo analitico utilizzato va presentato in un allegato). Dati comprovanti il fatto che le misurazioni si riferiscono alle concentrazioni della sostanza chimica in esame in soluzione vera.
- Qualità dell'acqua nelle vasche sperimentali: pH, durezza, temperatura e concentrazione di ossigeno dissolto.
- Informazioni dettagliate sul regime alimentare (ad esempio tipo di mangime, provenienza, quantità somministrata e frequenza) e analisi per rilevare la presenza di eventuali contaminanti (PCB, IPA e pesticidi organoclorurati, ad esempio).

Risultati

- Dati comprovanti il fatto che i controlli hanno soddisfatto i criteri di validità: i dati sul tasso di schiusa sono presentati sotto forma di tabelle che indicano la percentuale per replica e per concentrazione. I valori aberranti rispetto ai criteri di accettazione (nei controlli) vanno messi in evidenza. La sopravvivenza è presentata sotto forma di percentuale per replica e per concentrazione. I valori aberranti rispetto ai criteri di validità (nei controlli) vanno messi in evidenza.
 - Chiara indicazione dei risultati ottenuti rispetto ai diversi parametri osservati: sopravvivenza degli embrioni e successo della schiusa; anomalie esterne; peso e lunghezza; misurazioni della VTG (ng/g di omogenato, ng/ml di plasma o ng/mg di fegato); dati sull'istologia delle gonadi, rapporto numerico maschi/femmine e dati sul sesso genetico; incidenza delle eventuali reazioni anomale da parte dei pesci e di eventuali effetti visibili indotti dalla sostanza chimica in esame.
62. I risultati sono presentati come valori medi \pm la deviazione standard o l'errore standard. Le statistiche sono riportate almeno sotto forma di NOEL e LOEC e di intervalli di confidenza. Va seguito il diagramma statistico (appendice 8).

BIBLIOGRAFIA

- 1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test*, Test Guideline No. OCSE Guideline for the Testing of Chemicals No 210, Paris.
- 2) Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, and J.P. Sumpter, 1996, "Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals", *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, pp. 194-202.
- 3) Sumpter, J.P. and S. Jobling, 1995, "Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment", *Environmental Health Perspectives* 103, pp. 173-178.
- 4) Tyler, C.R., R.van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix, and H. Trip (1999), "An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin", *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, pp. 337-347.
- 5) Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen, and P. Bjerregaard (2001a), "Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*)", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 130, pp. 119-131.
- 6) Andersen, L., P. Bjerregaard, and B. Korsgaard (2003), "Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters", *Fish Physiology and Biochemistry* 28, pp. 319-321.
- 7) Orn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren, and G.I. Petersen (2003), "Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone", *Aquatic Toxicology* 65, pp. 397-411.

- 8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla, and C.R. Tyler (2002), "Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances", *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, pp. 319-326.
- 9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear, and Z.J. Wang (2007), "Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs, larvae and breeding adults", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, pp. 533-541.
- 10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc, and C.V. Sullivan (1999), "Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 123, pp. 113-125.
- 11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr, and J.M. Porcher (2002), "Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*)", *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, pp. 1699-1708.
- 12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara, and E. Tamiya (2002), "Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 132, pp. 161-169.
- 13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James, and B.E. Bengtsson (2004), "The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption — II — kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction", *Aquatic Toxicology* 70, pp. 311-326.
- 14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita, and T. Iguchi (2004), "Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka", *Journal of Health Science* 50, pp. 301-308.
- 15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson, and A. Goksoyr (2006), "Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin. Aquatic Toxicology", 78, pp. 202-206.
- 16) Jensen, K.M. and G.T. Ankley (2006), "Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)", *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, pp. 101-105.
- 17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S., Norrgren, L., and Bjerregaard, P (2001b), "Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597, pp. 48-51.
- 18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher, and A. Goksoyr (2004), "Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, pp. 621-633.
- 19) Orn, S., S. Yamani, and L. Norrgren (2006), "Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone", *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, pp. 237-243.
- 20) Scholz, S. and N. Kluver (2009), "Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, Sexual Development 3", pp. 136-151.
- 21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers, and H. Segner (2005), "An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*", *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, pp. 1088-1098.
- 22) OECD (2010), Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paris.
- 23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata, and Y. Nagahama (2004), "Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*", *Developmental Dynamics* 231, pp. 518-526.

- 24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi, and M. Sakaizumi (2004), "Field survey of sex-reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: genotypic sexing of wild populations", *Zoological Science* 21, pp. 613-619.
- 25) Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, and R.W. Flick (2007), "Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, pp. 8897-8901.
- 26) Palace,V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron, and K.A. Kidd (2009), "Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynodiol added to a whole lake", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 66, pp. 1920-1935.
- 27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno, and C. R. Tyler (2006), "Development of chronic tests for endocrine active chemicals — Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)", *Aquatic Toxicology* 77, pp. 279-290.
- 28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren, and P. Bjerregaard (2006), "Detection of endocrine disruptors: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 144, pp. 57-66.
- 29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard, and P. Bjerregaard (2004), "Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disruptors: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (*Danio rerio*)", *Fish Physiology and Biochemistry* 30, pp. 257-266.
- 30) Morthorst, J.E., H. Holbech, and P. Bjerregaard (2010), "Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations", *Aquatic Toxicology* 98, pp. 336-343.
- 31) Kiparissis,Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch, and C.D. Metcalf (2003), "Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*)", *Aquatic Toxicology* 63, pp. 391-403.
- 32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley, and C.R. Tyler (2004), "Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development", *Aquatic Toxicology* 70, pp. 11-21.
- 33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen, and P. Bjerregaard (2007), "Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*)", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, pp. 165-170.
- 34) Capitolo C.14 del presente allegato, Test di crescita del novellame.
- 35) Capitolo C.5 del presente allegato, Pronta biodegradabilità.
- 36) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.
- 37) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 229, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- 38) Capitolo C.37 del presente allegato, Prova sui pesci di 21 giorni: Screening a breve termine dell'attività estrogenica e androgenica e dell'inibizione dell'aromatasi.
- 39) OECD (2012), Fish Testing Framework, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Paris
- 40) No. 171 Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H (2007), "Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethynodiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, *Danio rerio*" *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*, 70, 9-10 pp 768-779.
- 41) OECD (2011), Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OECD, Paris.

- 42) OECD (2011), Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OECD, Paris.
 - 43) OECD (2011), Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test, Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OECD, Paris.
 - 44) Direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (GU L 276 del 20.10.2010, pag. 33).
-

Appendice 1

Abbreviazioni e definizioni

Endpoint apicale: indicatore di effetti a livello della popolazione

ASV: valore di saturazione dell'aria

Biomarcatore: indicatore di effetti a livello individuale

Sostanza chimica: sostanza o miscela

Dph (Days post hatch): giorni dopo la schiusa.

DMY: gene specifico del cromosoma Y della regione DM, indispensabile allo sviluppo dei caratteri di sesso maschile nel medaka giapponese.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): Prova di immunoassorbimento enzimatico

Peso del pesce: peso umido del pesce (asciugato per tamponamento)

FSDT (Fish Sexual Development Test): prova sullo sviluppo sessuale dei pesci

HPG (Hypothalamic-pituitary-gonadal): ipotalamo-ipofisi-gonadi

Pesce intersessuato: pesce che presenta più di un ovocita nei testicoli per gruppo di 6 sezioni analizzate oppure presenta (sì/no) cellule spermatogeniche nelle ovaie

Tasso di carico: peso umido dei pesci per volume di acqua

MOA: meccanismo di azione

RT-PCR: reazione a catena della polimerasi transcriptasi inversa

Sostanza chimica in esam: qualsiasi sostanza o miscela testata seguendo il presente metodo di prova.

Pesce indifferenziato: pesce le cui gonadi sono prive di cellule germinali visibili

VTG: vitellogenina

Appendice 2

Condizioni sperimentali per la prova sullo sviluppo sessuale dei pesci (specie di acqua dolce)

1. Specie raccomandata	Medaka giapponese (<i>Oryzias latipes</i>)	Pesce zebra (<i>Danio rerio</i>)	Spinarello (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
2. Tipo di prova	Flusso continuo o semistatica	Flusso continuo o semistatica	Flusso continuo o semistatica
3. Temperatura dell'acqua	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Qualità dell'illuminazione	Lampade fluorescenti (ad ampio spettro)	Lampade fluorescenti (ad ampio spettro)	Lampade fluorescenti (ad ampio spettro)
5. Intensità luminosa	10-20 µE/m ² /s, 540-1 080 lux, o 50-100 ft-c (livelli ambientali del laboratorio)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 080 lux, o 50-100 ft-c (livelli ambientali del laboratorio)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 080 lux, o 50-100 ft-c (livelli ambientali del laboratorio)
6. Fotoperiodo	12-16 ore di luce, 8-12 ore di buio	12-16 ore di luce, 8-12 ore di buio	16 ore di luce, 8 ore di buio
7. Volume minimo delle vasche	Ciascuna vasca deve contenere almeno 7 litri d'acqua	Ciascuna vasca deve contenere almeno 7 litri d'acqua	Ciascuna vasca deve contenere almeno 7 litri d'acqua
8. Sostituzione del volume delle soluzioni di prova	Minimo 5 volte al giorno	Minimo 5 volte al giorno	Minimo 5 volte al giorno
9. Età degli organismi sperimentali all'inizio dell'esposizione	Uova appena fecondate (stadio iniziale di blastula)	Uova appena fecondate (stadio iniziale di blastula)	Uova appena fecondate
10. Numero di uova per trattamento	Minimo 120	Minimo 120	Minimo 120
11. Numero di trattamenti	Minimo 3 (più controlli appropriati)	Minimo 3 (più controlli appropriati)	Minimo 3 (più controlli appropriati)
12. Numero di repliche per trattamento	Minimo 4 (salvo attribuzione per radice quadrata ai controlli)	Minimo 4 (salvo attribuzione per radice quadrata ai controlli)	Minimo 4 (salvo attribuzione per radice quadrata ai controlli)
13. Dieta	Esemplari di Artemia vivi, adulti congelati di <i>Artemia salina</i> , mangime in fiocchi, ecc. Si raccomanda di nutrire i pesci due volte al giorno.	Frittura speciale di naupli, Artemia vivi, esemplari adulti congelati di <i>Artemia salina</i> , mangime in fiocchi, ecc. Si raccomanda di nutrire i pesci due volte al giorno	Esemplari di Artemia vivi, adulti congelati di <i>Artemia salina</i> , mangime in fiocchi, ecc. Si raccomanda di nutrire i pesci due volte al giorno

14. Aerazione	Nessuna, tranne quando la concentrazione di ossigeno dissolto è inferiore al 60 % del valore di saturazione dell'aria	Nessuna, tranne quando la concentrazione di ossigeno dissolto è inferiore al 60 % del valore di saturazione dell'aria	Nessuna, tranne quando la concentrazione di ossigeno dissolto è inferiore al 70 % del valore di saturazione dell'aria
15. Acqua di diluizione	Acque di superficie, pozzi o ricostituita	Acque di superficie, pozzi o ricostituita	Acque di superficie, pozzi o ricostituita
16. Durata dell'esposizione alla sostanza chimica in esame	60 giorni dopo la schiusa	60 giorni dopo la schiusa	60 giorni dopo la schiusa
17. Parametri biologici misurati (endpoint)	Riuscita della schiusa, sopravvivenza, morfologia macroscopica, VTG, istologia gonadica, sesso genetico, rapporto numerico maschi/femmine	Riuscita della schiusa, sopravvivenza, morfologia macroscopica, VTG, istologia gonadica, rapporto numerico maschi/femmine	Riuscita della schiusa, sopravvivenza, morfologia macroscopica, VTG, istologia gonadica, rapporto numerico maschi/femmine
18. Criteri di accettabilità del test per l'insieme delle repliche di controllo	Schiusa riuscita > 80	Schiusa riuscita > 80	Schiusa riuscita > 80
	Sopravvivenza post-schiusa ≥ 70 %	Sopravvivenza post-schiusa ≥ 70 %	Sopravvivenza post-schiusa ≥ 70 %
	Crescita (peso fresco del pesce (asciugato per tamponamento) > 150 mg	Crescita (peso fresco del pesce (asciugato per tamponamento) > 75 mg	Crescita (peso fresco del pesce (asciugato per tamponamento) > 120 mg
	Lunghezza (lunghezza standard) > 20 mm	Lunghezza (lunghezza standard) > 14 mm	Lunghezza (lunghezza standard) > 20 mm
	Rapporto maschi/femmine 30 %-70 %	Rapporto maschi/femmine 30 %-70 %	Rapporto maschi/femmine 30 %-70 %

*Appendice 3***Caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione accettabile**

COMPONENTE	CONCENTRAZIONE
Particolato	< 20 mg/l
Carbonio organico totale	< 2 mg/l
Ammoniaca non ionizzata	< 1 ug/l
Cloro residuo	< 10 ug/l
Pesticidi organofosforati totali	<50 ng/l
Pesticidi organoclorurati totali più difenili policlorurati	<50 ng/l
Cloro organico totale	< 25 ng/l

Appendice 4

Estratto del metodo di prova C.14/Orientamenti per le concentrazioni della sostanza chimica in esame

Colonna (numero di concentrazioni fra 100 e 10 o fra 10 e 1 (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Da ciascuna colonna è possibile scegliere una serie di tre (o più) concentrazioni successive. I punti intermedi fra le concentrazioni nella colonna (x) si trovano nella colonna (2x + 1). I valori elencati possono rappresentare le concentrazioni espresse come percentuale per volume o peso (mg/l o ug/l). I valori possono essere moltiplicati o divisi per qualsiasi potenza di 10 a seconda del caso. È possibile usare la colonna 1 in caso di notevoli incertezze sul livello di tossicità.

Appendice 5

Orientamenti per l'omogeneizzazione della testa e della coda di esemplari giovani delle specie ittiche *Danio rerio*, *pimephales promelas*, *gasterosteus aculeatus* e *oryzias latipes*

La presente sezione descrive le procedure che precedono la quantificazione della concentrazione della VTG. Possono essere utilizzate altre procedure che diano come risultato una quantificazione simile della VTG. In alternativa all'uso dell'omogenato testa/coda, la concentrazione della VTG può essere determinata anche dal plasma sanguigno o dal fegato.

Procedura

1. I pesci sono anestetizzati e soppressi con metodo non cruento secondo la descrizione della prova.
2. La testa e la coda dei pesci sono tagliate conformemente alla descrizione della prova. **Nota importante:** Tutti gli strumenti di dissezione e il tagliere vanno sciacquati e lavati accuratamente (ad es. con etanolo al 96 %) prima della manipolazione di ciascun pesce per evitare una "contaminazione da vitellogenina" dalle femmine o maschi trattati ai maschi non trattati.
3. Il peso della testa/coda (insieme) di ciascun pesce è misurato con precisione al milligrammo.
4. Dopo essere stati pesati, le parti sono inserite in apposite provette (ad esempio 1,5 ml Eppendorf) e congelate ad una temperatura di – 80 °C fino alla loro omogeneizzazione oppure direttamente omogeneizzati in ghiaccio con 2 pestelli di plastica (possono essere utilizzati altri metodi se sono validi per lavorare con il ghiaccio e permettono di ottenere una massa omogenea). **Nota importante:** Le provette vanno numerate in modo che la testa e la coda del pesce possano essere collegate alla rispettiva sezione del corpo utilizzata per l'esame istologico delle gonadi.
5. Dopo aver ottenuto una massa omogenea, aggiungere un **tampone di omogeneizzazione** (*) a temperatura di 0 °C, pari a 4-10 volte la massa ponderale dei tessuti (annotare la diluizione). Continuare a lavorare con i pestelli fino a che la miscela risulti omogenea. **Nota importante:** Nuovi pestelli vanno utilizzati per ciascun esemplare.
6. I campioni vanno conservati in ghiaccio fino alla centrifugazione a 50 000 g per 30 minuti a una temperatura di 4 °C.
7. Usare una pipetta per distribuire volumi di 20-50 µl (annotare la quantità) del supernatante in **almeno due** provette, immergendo la punta della pipetta al di sotto dello strato lipidico in superficie e aspirando con cautela il supernatante privo di parti grasse o granuli.
8. Le provette sono conservate ad una temperatura di – 80 °C fino all'uso.

(*) **Tampone di omogeneizzazione:**

50 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 % cocktail di inibitori di proteasi (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl cocktail di inibitori di proteasi (o cocktail di inibitori di proteasi equivalenti).

TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN)

Cocktail di inibitori di proteasi: da Sigma (per i tessuti di mammiferi), n. del prodotto **P 8340**.

Nota: Il tampone di omogeneizzazione va utilizzato il giorno stesso in cui è preparato. Mantenere nel ghiaccio durante l'uso.

Appendice 6

Orientamenti per la quantificazione della vitellogenina da omogenato testa/coda nel danio zebrato (*Danio rerio*) (modificato da holbech et al., 2001). Possono essere utilizzate altre procedure che utilizzano anticorpi e standard omogenei

1. Scongelare le piastre per microtitolazione (certificate Maxisorp F 96, Nunc, Roskilde, Danimarca), precedentemente ricoperte di 5 µg/ml di anti-IgG di lipovitellina di pesce zebra, quindi lavarle 3 volte con un tampone di lavaggio (*).
2. Diluire in serie lo standard di vitellogenina di danio zebrato purificato (¹) in ragione di 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 ng/ml in tampone di diluizione (**) e diluire i campioni in almeno 200 volte (per evitare l'effetto matrice) in tampone di diluizione applicare sulle piastre. Applicare un controllo di prova in duplicato. Versare 150 µl in ogni pozzetto. Gli standard sono applicati in duplicato e i campioni in tre copie. Incubare per una notte a 4 °C su agitatore.
3. Lavare le piastre 5 volte con il tampone di lavaggio (*).
4. Diluire HPR associato ad una catena di destrano (AMDEX A/S, Danimarca, per esempio) e gli anticorpi coniugati in tampone di lavaggio. La diluizione effettiva differisce a seconda del lotto e dell'età. Versare 150 µl in ogni pozzetto e applicare le piastre in incubazione per 1 ora a temperatura ambiente su agitatore.
5. Lavare le piastre 5 volte con il tampone di lavaggio (*) e pulire accuratamente il fondo delle piastre con etanolo.
6. Versare 150 µL di TMB plus (***) in ogni pozzetto. Proteggere le piastre dalla luce con carta alluminio e osservare il cambiamento di colore su agitatore.
7. Una volta ottenuta la curva standard, fermare l'attività enzimatica versando 150 µl 0,2 M H₂SO₄ in ogni pozzetto.
8. Misurare l'assorbanza a 450 nm (ad. es. su un lettore di piastra di dispositivi molecolari Thermomax). Analizzare i dati sul software associato (Softmax, ad esempio).

(*) Tampone di lavaggio:

Stock di PBS (****)	500,0 ml
---------------------	----------

BSA	5,0 g
-----	-------

Tween 20	5,0 ml
----------	--------

Aggiustare il pH a 7,3 e riempire fino a 5 l con H₂O filtrata su membrana Millipore. Conservare a 4 °C.

(**) Tampone di diluizione:

Stock di PBS (****)	100,0 ml
---------------------	----------

BSA	3,0 g
-----	-------

Tween 20	1,0 ml
----------	--------

Aggiustare il pH a 7,3 e riempire fino a 1 l con H₂O filtrata su membrana Millipore. Conservare a 4 °C.

(¹) Battelle AP 4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)], purificata conformemente a: Denslow, N.D., Chow, M.C., KROLL, K.J., Green, L. (1999). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen estrogen 10.ora mimics. Ecotoxicology 8: 385-398.

(***) TMB plus è un substrato "pronto all'uso" prodotto dalla KemEnTec (Danimarca). È fotosensibile. Conservare a 4 °C

(****) PBS stock

NaCl	160,0	g
KH ₂ PO ₄	4,0	g
Na ₂ HPO ₄ ,2H ₂ O	26,6	g
KCl	4,0	g

Aggiustare il pH a 6,8 e riempire fino a 2 l con H₂O filtrata su membrana Millipore. Conservare a temperatura ambiente.

Appendice 7

Orientamenti per la preparazione delle sezioni tessutali per la determinazione del sesso e la classificazione dello stadio di sviluppo delle gonadi

Questa parte descrive le procedure che precedono la valutazione delle sezioni istologiche. Possono essere utilizzate anche altre procedure che consentano risultati analoghi nella determinazione del sesso e nella classificazione dello stadio di sviluppo delle gonadi.

Salvo alcune eccezioni, queste procedure sono simili per il medaka giapponese e il pesce zebra.

Soppressione incruenta, necropsia e fissazione dei tessuti

Obiettivi:

1. Soppressione dei pesci in modo incruento.
2. Ottenimento del peso e delle misure necessarie.
3. Valutazione dei caratteri sessuali secondari.
4. Sezionamento dei tessuti per l'analisi della VTG.
5. Fissazione delle gonadi.

Procedure

1. Sopprimere i pesci immediatamente prima della necropsia. Pertanto, a meno che non siano disponibili numerosi prosettori, non va sacrificato simultaneamente un gran numero di pesci.
2. Mediante retino, trasferire un pesce dalla vasca sperimentale verso la zona di necropsia nel contenitore di trasporto.
3. Inserire il pesce nella soluzione di soppressione e rimuoverlo quando non respira più e non risponde più agli stimoli esterni.
4. Misurare il peso umido del pesce.
5. Per la preparazione dei tessuti ai fini dell'analisi della VTG, il pesce può essere posto su una piastra di sughero sulla piattaforma di un microscopio da dissezione.
 - a. Nel caso del pesce zebra, tagliare la testa immediatamente dietro la pinna pettorale e la coda immediatamente dietro la pinna dorsale.
 - b. Nel caso del medaka giapponese, aprire l'addome praticando con cautela un'incisione lungo la linea mediana del ventre dal cingolo pettorale fino ad un punto immediatamente anteriore all'ano. Asportare il fegato delicatamente con l'ausilio di pinzette e forbicine.
6. Inserire campioni destinati all'analisi della VTG in provette Eppendorf e congelare immediatamente in azoto liquido.
7. Porre la carcassa con le gonadi in una cassetta di tessuto di plastica pre-etichettata che sarà trasferita in un liquido fissativo di Bouin o di Davidson. Il volume di fissativo deve essere superiore o uguale a 10 volte il volume approssimativo dei tessuti. Agitare delicatamente il contenitore col fissante per cinque secondi in modo da evacuare le bolle d'aria dalla cassetta.
8. a. Lasciare tutti i tessuti nel fissativo di Davidson per una notte quindi trasferirli in singoli contenitori con formalina tamponata al 10 % il giorno successivo. Agitare delicatamente i contenitori con le cassette per cinque secondi affinché la formalina penetri adeguatamente nelle cassette.
- b. Lasciare i tessuti nel fissativo di Bouin per 24 ore e poi trasferirli in etanolo al 70 %.

Trattamento dei tessuti

Obiettivi:

1. Disidratare i tessuti per un'idonea penetrazione della paraffina.
2. Impregnare i tessuti di paraffina per mantenere l'integrità dei tessuti e creare una solida superficie per la microtomia.

Procedure:

3. Ritirare le cassette etichettate contenenti i tessuti dalla conservazione di formolo/etanolo e inserirle nel/i cestello/i di trattamento. Caricare il cestello nell'apparecchio di trattamento.
4. Selezionare il programma di trattamento.
5. Alla fine del ciclo di trattamento, il o i cestelli porta cassette può/possono essere trasferiti alla centralina di inclusione (*embedding station*).

Inclusione (Embedding)

Obiettivo:

Posizionare correttamente il campione nella paraffina solidificata ai fini della microtomia.

Procedure:

1. Ritirare il cestello porta cassette dall'apparecchio e immergere il cestello nel primo recipiente, riempito di paraffina, della console termica della centralina di inclusione, oppure spostare le cassette verso un riscaldatore di paraffina separato.
2. Ritirare la prima cassetta da includere dal primo recipiente della console o del riscaldatore di paraffina. Togliere ed eliminare il coperchio della cassetta; confrontare l'etichetta della cassetta con i dati registrati relativi agli animali al fine di correggere eventuali discrepanze prima dell'inclusione.
3. Selezionare uno stampo per cassette per inclusione delle dimensioni adeguate.
4. Posizionare lo stampo sotto il beccuccio della console di distribuzione e riempirlo di paraffina liquida.
5. Togliere il campione dalla cassetta e inserirlo nello stampo riempito di paraffina liquida. Ripetere l'operazione con 4-8 campioni per ciascuno stampo di paraffina. Marcare la posizione di ogni pesce posizionando il pesce n. 1 a 180 gradi rispetto al pesce 2-4/8.
6. Aggiungere altra paraffina fino a coprire il campione.
7. Inserire lo stampo con il fondo della cassetta sulla piastra di raffreddamento della console criogenica.
8. Dopo che la paraffina si è solidificata, rimuovere il blocchetto (ossia la paraffina indurita contenenti i tessuti e il fondo della cassetta) dallo stampo.

Microtomia

Obiettivo

Sezionamento delle fette istologiche e preparazione dei relativi vetrini ai fini della colorazione.

Procedure

1. La fase iniziale della microtomia, denominata "facing", si svolge come segue:
 - a. Inserire il blocchetto di paraffina nel porta-blocco del microtomo.
 - b. Far avanzare il porta-blocco ruotando la ruota del microtomo; tagliare spesse sezioni dalla superficie del blocchetto di paraffina fino a quando la lama raggiunga i tessuti inclusi.

- c. Regolare lo spessore delle sezioni tagliate nel microtomo su 3-5 micron. Far avanzare il porta-blocco e tagliare sezioni multiple dal blocco per eliminare eventuali irregolarità createsi sulla superficie di taglio del tessuto in fase di preparazione.
 - d. Togliere il blocchetto dal porta-blocco e posizionarlo a rovescio sul ghiaccio per imbevere il tessuto.
2. La fase successiva della microtomia consiste nel preparare le sezioni finali e nel montarle sui vetrini. La procedura è descritta di seguito.
- a. Se il blocchetto è stato posizionato sul ghiaccio, togliere il blocchetto dal ghiaccio e rimetterlo nel porta-blocco del microtomo.
 - b. Con lo spessore del taglio regolato su 3-5 micron, far avanzare il porta-blocco ruotando la ruota del microtomo. Tagliare sezioni dal blocchetto fino a formare un "nastro" di sezioni contenente almeno una sezione accettabile comprendente le gonadi. (Se necessario durante il taglio, rimuovere il blocchetto dal porta-blocco, posizionarlo sul ghiaccio per imbevere il tessuto e riporlo nel porta-blocco).
 - c. Immergere le sezioni nel bagno d'acqua facendole galleggiare sulla superficie. Adoperarsi per ottenere almeno una sezione senza pieghe e senza bolle d'aria imprigionate al di sotto.
 - d. Immergere un vetrino al di sotto della migliore sezione in modo da sollevarla dall'acqua. Quest'operazione è detta "distensione" della sezione su vetrini.
 - e. Preparare tre sezioni per un gruppo di pesci. Tagliare la seconda e la terza sezione ad intervalli di 50 micron di distanza dalla prima. Se i pesci non sono inclusi con le gonadi allo stesso livello di sezionamento, effettuare ulteriori tagli per ottenere almeno sei sezioni comprendenti le gonadi da ciascun pesce.
 - f. Scrivere sul vetrino, con apposita penna, il numero del blocco a partire dal quale il vetrino è stato ottenuto.
 - g. Inserire il vetrino nel cestello di colorazione.
 - h. Togliere il blocchetto dal porta-blocco e posizionarlo a rovescio per la conservazione.

Colorazione, applicazione di vetrini copri-oggetti ed etichettatura dei vetrini

Obiettivi:

- Colorazione delle sezioni per l'analisi istopatologica.
- Chiusura permanente dei tessuti distesi su vetrini e colorati.
- Identificazione permanente delle sezioni colorate in modo da garantirne una completa tracciabilità.

Procedure:

1. Colorazione
 - a. Far asciugare i vetrini all'aria per una notte prima della loro colorazione.
 - b. Procedere alla colorazione dei vetrini con ematossilina eosina.
2. Applicazione di vetrini copri-oggetti
 - a. I vetrini copri-oggetti possono essere applicati manualmente o automaticamente.
 - b. Immergere un vetrino in xilene o Tissue-Clear®, quindi rimuovere l'eccesso di prodotto scuotendo delicatamente il vetrino.
 - c. Applicare circa 0,1 ml di sostanza di montaggio vicino al bordo del vetrino opposto al bordo smerigliato o sul vetrino coprioggetti.
 - d. Applicare al vetrino il vetrino coprioggetti inclinando leggermente.

3. Etichettatura

- a. L'etichetta riporta le seguenti informazioni:
- i. Nome del laboratorio
 - ii. Specie
 - iii. Campione n. / Vetrino n.
 - iv. Sostanza chimica / Gruppo di trattamento
 - v. Data
-

Appendice 8

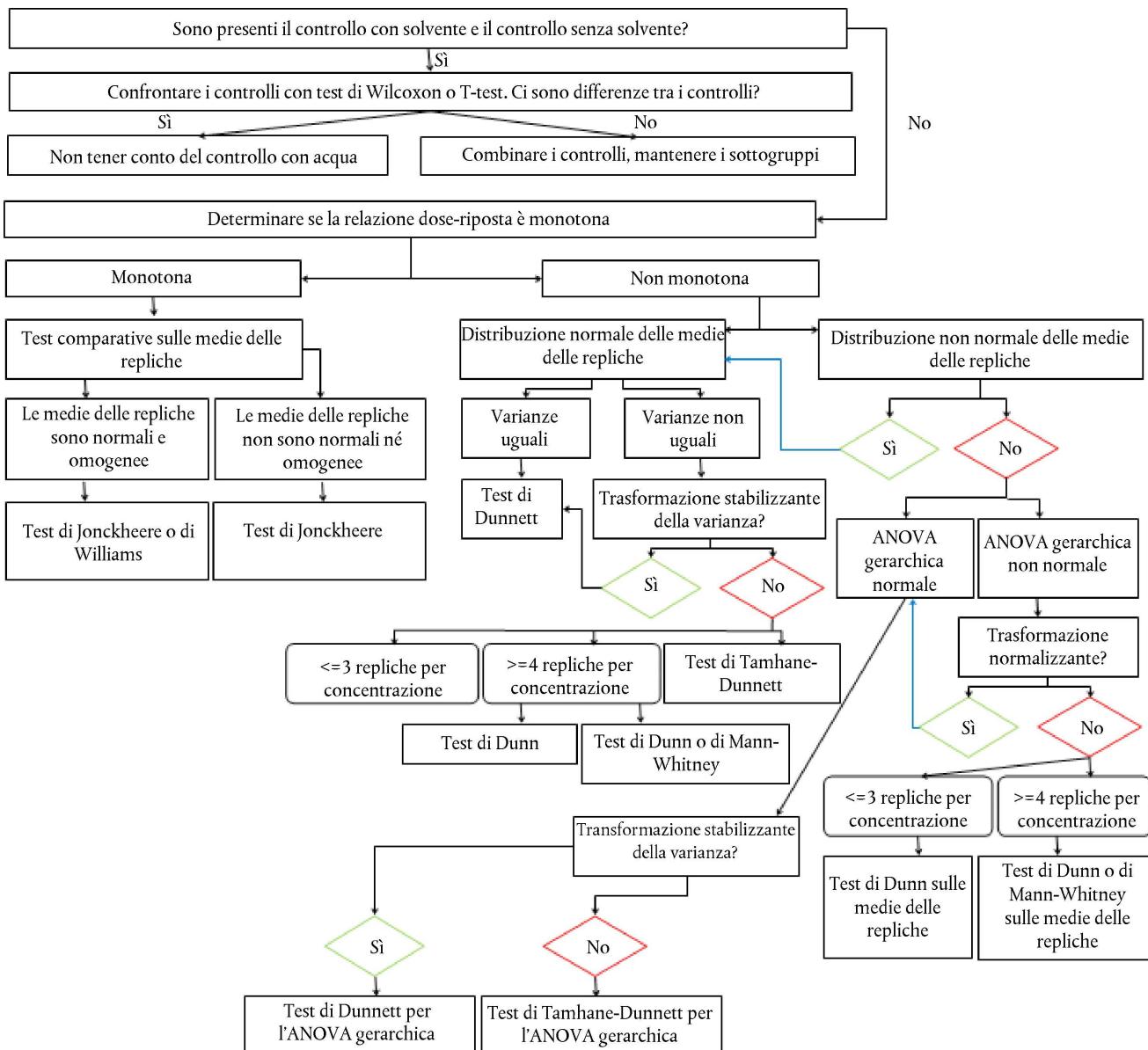
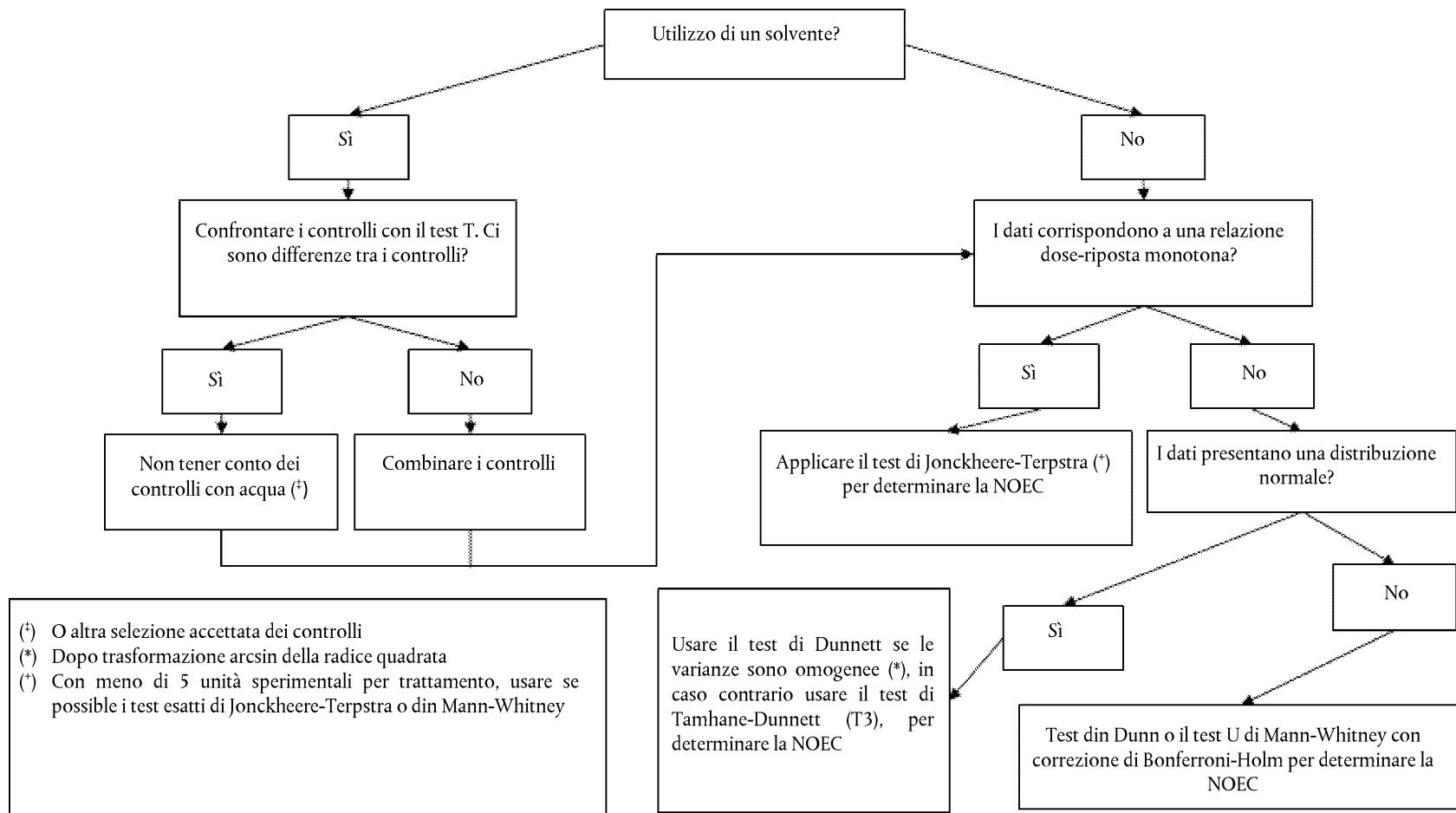
Diagramma decisionale statistico per l'analisi della vitellogenina

Diagramma decisionale statistico per l'analisi del rapporto numerico maschi/femmine



Appendice 9

Orientamenti per il campionamento di tessuti ai fini della determinazione del sesso genetico mediante reazione a catena della polimerasi (PCR)

Campionamento, preparazione e conservazione dei tessuti ai fini della determinazione del sesso genetico mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) nel medaka (elaborati dal Laboratorio per gli organismi acquatici della Bayer CropScience AG)

1. Con le forbici tagliare la pinna anale o dorsale di ciascun pesce e inserirla in una provetta riempita con 100 µl di tampone di estrazione 1 (per la preparazione del tampone si veda *infra*). Pulire le forbici dopo averle usate su ciascun pesce in un becher contenente acqua distillata e asciugarle con carta assorbente.
2. Omogeneizzare i tessuti provenienti dalle pinne con pestello in Teflon per micro-provette al fine di ottenere la lisi delle cellule. Per ogni provetta, utilizzare un pestello nuovo in modo da evitare contaminazioni. Durante la notte, inserire i pestelli in 0,5 M di NaOH, sciacquare per 5 minuti in acqua distillata, poi conservarli in etanolo o in ambiente sterile dopo averli sterilizzati mediante autoclave fino all'utilizzo.
3. È anche possibile conservare i tessuti provenienti dalle pinne senza tampone di estrazione 1 su ghiaccio secco, quindi in un frigorifero a una temperatura di – 80 °C per evitare la degenerazione del DNA. Tuttavia, l'estrazione ha un esito migliore se il DNA è estratto simultaneamente (per la manipolazione, cfr. supra; scongelare i campioni in ghiaccio dopo conservazione alla temperatura di – 80 °C prima di riempire le provette con il tampone).
4. Dopo aver omogeneizzato tutte le provette, metterle a bagnomaria e far bollire per 15 minuti a una temperatura di 100 °C.
5. Immettere in ciascuna provetta 100 µl di tampone di estrazione 2 (per la preparazione del tampone si veda *infra*) con l'ausilio di una pipetta. Conservare i campioni a temperatura ambiente per 15 minuti e, contemporaneamente, agitarli delicatamente di tanto in tanto con le mani.
6. Riportare nuovamente tutte le provette nel bagnomaria e far bollire per 15 minuti a una temperatura di 100 °C.
7. Fino alla successiva analisi, congelare le provette a – 20 °C.

Preparazione del tampone

Tampone 1 utilizzato per il PCR:

500 mg di n-lauroilsarcosina (ad es. Merck KGaA, Darmstadt, DE)

2 ml 5M di NaCl

Aggiungere 100 ml di acqua distillata.

→ Autoclave

Tampone 2 utilizzato per il PCR:

20 g Chelex (ad es. Biorad, Munich, DE)

Idratare in 100 ml di acqua distillata.

→ Autoclave

Determinazione del sesso genetico (mediante tecnica PCR) in *Orizys latipes* (medaka) (elaborata dal Laboratorio per gli organismi acquatici della Bayer CropScience AG e dalla Universität Würzburg Biozentrum)

Scongelare le provette preparate e congelate (come descritto nella sezione precedente) nel ghiaccio. Successivamente, centrifugare le provette con una centrifuga Eppendorf (30 secondi alla velocità massima a temperatura ambiente). Per la PCR, usare il supernatante chiaro separato dal precipitato. È assolutamente fondamentale assicurare che nessuna traccia di Chelex (situato nel precipitato) sia trasferita nella reazione PCR, poiché ciò causerebbe gravi interferenze con l'attività della Taq polimerasi. Utilizzare direttamente il supernatante oppure congelarlo (a – 20 °C) e poi farlo nuovamente scongelare in diversi cicli senza effetti negativi sul DNA per le analisi successive.

1. *Preparazione della miscela di reazione (25 µl per campione):*

	Volume	Concentrazione finale
Modello di DNA	0,5µl-2µl	
Tampone 10x PCR con MgCl ₂	2,5µl	1x
Nucleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4µl (5mM)	200µM
Forward Primer (10µM) (v. infra par. 3-5)	0,5µl	200nM
Reverse primer (10µM) (v. infra par. 3-5)	0,5µl	200nM
DMSO	1,25µl	5 %
Acqua (qualità PCR)	Fino a 25 µl	
Taq Polymerasi E-	0,3µl	1,5U
Tampone 10x PCR con MgCl ₂ : 670mM Tris/HCl (pH 8,8 a 25 °C), 160mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 25mM MgCl ₂ , 0,1 % Tween 20		

Per ciascuna PCR (cfr. 3-5), è necessario il primer speciale come nuova combinazione di "miscela di reazione" e il volume necessario del modello di DNA adeguato per ciascun campione (cfr. supra). I rispettivi volumi sono trasferiti in nuove provette mediante pipette. Le provette sono quindi chiuse, agitate (per ca. 10 secondi) e centrifugate (per 10 secondi a temperatura ambiente). A questo punto i rispettivi programmi di PCR possono essere avviati. In aggiunta, saranno utilizzati un controllo positivo (campione di DNA esemplare, la cui attività sia conosciuta e i risultati siano chiari) e un gruppo di controllo negativo (1 µl di acqua distillata) in ciascun programma di PCR.

2. *Preparazione del gel di agarosio (1 %) — durante lo svolgimento dei programmi di PCR:*

- Sciogliere 3 g di agarosio in 300 ml di soluzione tampone TAE 1 × (gel di agarosio 1 %)
- Portare la soluzione ad ebollizione a microonde (2-3 minuti circa)
- Trasferire la soluzione liquida nell'apposito stampo, appoggiato sul ghiaccio
- Dopo circa 20 minuti, il gel di agarosio è pronto per l'uso
- Conservare il gel di agarosio nella soluzione tampone TAE 1 × fino al completamento dei programmi della PCR

3. *Programma di PCR per actine:*

Questa reazione PCR è intesa a dimostrare che il DNA presente nel campione non è danneggiato

- Primer specifico:

"Mact1(upper/forward)" → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

"Mact2(lower/reverse)" → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

- Programma:

5 min 95 °C

Ciclo (35-volte):

Denaturazione → 45 sec a 95 °C

Ibridazione → 45 sec a 56 °C

Estensione → 1 minuti a 68 °C.

15 min 68 °C

4. *Programma di PCR per geni X e Y:*

I campioni di DNA intatto saranno utilizzati in questo programma di PCR per individuare i geni X e Y. Il DNA maschile dovrebbe mostrare una doppia banda e il DNA femminile una sola banda (dopo la colorazione e l'elettroforesi su gel di agarosio). Per questo programma vanno inclusi un controllo positivo per i maschi (campione XY) e uno per le femmine (campione XX).

— Primer specifico:

“PG 17.5” (upper/forward) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

“PG 17.6” (lower/reverse) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Programma:

5 min 95 °C

Ciclo (40-volte):

Denaturazione → 45 sec a 95 °C

Ibridazione → 45 sec a 55 °C

Estensione → 1 min 30 sec a 68 °C

15 min 68 °C

5. *Programma di PCR per gene Y che funge da “controllo” per il programma PCR per geni X e Y:*

Questo programma consente di verificare i risultati del “programma di PCR per geni X e Y”. I “campioni maschili” dovrebbero mostrare una banda e i “campioni femminili” non ne dovrebbero mostrare nessuna (dopo la colorazione e l'elettroforesi su gel di agarosio).

— Primer specifico:

“DMTYa (upper/forward)” → GGC CGG GTC CCC GGG TG

“DMTYd (lower/reverse)” → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Programma:

5 min 95 °C

Ciclo (40-volte):

Denaturazione → 45 sec a 95 °C

Ibridazione → 45 sec a 56 °C

Estensione: → 1 minuti a 68 °C.

15 min 68 °C

6. *Colorazione dei campioni di PCR:*

Soluzione colorante:

50 % Glicerina

100 mM EDTA

1 % SDS

0,25 di Blu di bromofenolo

0,5 % di xilencianolo

Versare 1 µL della soluzione colorante in ciascuna provetta mediante pipetta.

7. *Inizio dell'elettroforesi su gel di agarosio:*

— Trasferire la preparazione di gel di agarosio 1 % in una cella per l'elettroforesi su gel riempita di tampone TAE 1X

— Versare 10-15 µl di ogni campione di PCR colorato in un pozzetto di gel di agarosio servendosi di una pipetta

- Versare 5-15 µl di 1kb- "Ladder" (invitrogeno) in un pozzetto separato per mezzo di una pipetta
 - Iniziare l'elettroforesi a 200 V
 - Terminare dopo 30-45 minuti
8. *Determinazione delle bande*
- Pulire il gel di agarosio con acqua distillata.
 - Trasferire il gel di agarosio in etidio bromuro per 15-30 minuti
 - Fotografare il gel di agarosio con lampada a raggi ultravioletti
 - Analizzare i campioni confrontandoli con la banda/le bande di controllo positive e con il ladder.
-

Appendice 10

Orientamenti per il campionamento di tessuti al fine della determinazione del sesso genetico mediante reazione a catena della polimerasi nello spinarello

Campionamento dei tessuti ed estrazione del DNA

Il DNA può essere estratto mediante diversi reagenti disponibili in commercio, e utilizzando tecniche di estrazione sia manuali sia automatiche. Il protocollo utilizzato presso il laboratorio CEFAS di Weymouth è descritto in appresso; sono stati aggiunti metodi alternativi, ove opportuno.

1. Mediante forbicine recidere un piccolo pezzo tissutale (10-20 mg) dall'area dorso-laterale (dopo aver rimosso la testa e la coda per la misura della vitellogenina) da ciascun esemplare. Il tessuto è inserito in una provetta e collocato direttamente nell'azoto liquido (per conservazione a -80 °C) oppure riempito con etanolo al 70 % (per il trasporto e la conservazione a 4 °C). Pulire le forbici dopo il trattamento di ciascun pesce in etanolo al 70 % e quindi immerse in acqua distillata; asciugare con carta assorbente.
2. L'etanolo (se presente) è eliminato per aspirazione e il tessuto viene digerito durante la notte con proteinasi K in 400 µl di tampone ATL (Qiagen). Una porzione (200 µl) del prodotto della digestione è trasferito in un S-Block (Qiagen) con 96 pozzetti e il DNA estratto in un formato con 96 pozzetti utilizzando il Qiagen Universal BioRobot e il Qlamp Investigator BioRobot kit. Eluire il DNA in 50 µl di acqua priva di DNase e RNase. Se si utilizzano tessuti duri per estrarre il DNA (quali la spina dorsale o la pinna pettorale) può essere necessario omogeneizzare il campione nel tampone di lisi con FastPrep® o un sistema equivalente di disgregazione dei tessuti.

In alternativa:

- (a) Il tessuto è digerito durante la notte con la proteinasi K in 400 µl di tampone di lisi G2 (Qiagen), il DNA estratto da 200 µl del prodotto della digestione, utilizzando il kit EZ-1 DNA Easy Tissue e l'EZ-1 biorobot oppure il kit DNA Easy Mini Tissue. Il DNA è eluito in un volume di 50 µl.
 - (b) I campioni di tessuto sono sottoposti al reagente DNAzol. In sintesi, i tessuti sono sottoposti a lisi in 1 ml di DNAzol per 10 minuti in una microprovetta da centrifuga da 1,5 ml e quindi centrifugati a 13 000 rpm per 5 minuti al fine di eliminare tutte le particelle solide. Il campione sottoposto a lisi viene quindi trasferito in una provetta da centrifuga da 1,5 ml contenente 500 µl di etanolo al 100 % e quindi centrifugato per 10 minuti a 13 000 rpm per far precipitare il DNA. L'etanolo è eliminato e sostituito con 400 µl di etanolo al 70 % di qualità molecolare, centrifugare per 5 minuti a 13 000 rpm e sciogliere il pellet di DNA in 50 µl di acqua priva di DNase e RNase. Anche in questo caso, se si utilizzano tessuti duri per estrarre il DNA (quali la spina dorsale o la pinna pettorale) può essere necessario omogeneizzare il campione nel tampone di lisi con FastPrep® o un sistema equivalente di disgregazione dei tessuti, prima dell'estrazione del DNA.
3. Il DNA è conservato a – 20 °C fino all'utilizzo.

Nota importante: Indossare guanti durante la manipolazione

Analisi mediante reazione a catena della polimerasi (PCR).

Le amplificazioni sono state realizzate mediante 2,5 µL di DNA estratto in un volume di reazione di 50 µl utilizzando IDH locus primer (come descritto da Peichel et al, 2004. Current Biology 1: 1416-1424):

Forward primer 5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'

Reverse primer Y-2 5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

Esistono diversi fornitori di idonei reattivi per l'analisi PCR. Il metodo seguente è quello attualmente utilizzato presso il laboratorio CEFAS di Weymouth.

1. Preparazione della miscela di reazione (50 µl per campione):

La miscela di reazione è preparata come segue; può essere preparata in anticipo e conservata a – 20 °C fino all'utilizzo. Preparare una quantità sufficiente di miscela di reazione per un controllo negativo (solo acqua di qualità di biologia molecolare).

	Volume (stock conc.)/ sample Volume (concentrazione dello stock)/campione	Concentrazione finale
Tampone di reazione 5xGoTaq®	10µl	1x
MgCl ₂	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nucleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (25 mM ciascuno)	250 µM ciascuno
Forward Primer	0,5µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Reverse primer Y-2	0,5µl (0,1 mol/µl)	2,0µM
Acqua di qualità biologia molecolare	30,75 µl	
GoTaq polymerasi	0,25 µl	1,25U

- Versare 47,5 µl in una provetta a parete sottile di PCR da 0,5 ml, etichettata.
- Aggiungere 2,5 µl di DNA purificato nella provetta etichettata in modo appropriato; ripetere l'operazione per tutti i campioni e per il controllo negativo;
- Aggiungere, sulla superficie, 2 gocce di olio minerale. In alternativa, utilizzare un termociclatore con coperchio riscaldato.
- Chiudere i coperchi
- Denaturare i campioni in termociclatore Peltier PTC-225 a 94 ± 2 °C per 5 minuti seguiti da 39 cicli di 94 ± 2 °C per 1 minuto, 55 ± 2 °C per 1 minuto, 72 ± 2 °C per 1 minuto, e una estensione finale di 72 ± 2 °C per 10 minuti.

2. Preparazione del gel di agarosio (2 %):

Tradizionalmente i prodotti della PCR sono risolti su gel di agarosio al 20 % con etidio bromuro.

Possono essere utilizzati anche sistemi di elettroforesi capillare.

- Pesare 2 g di agarosio in 100 ml di tampone TAE 1 ×
- Riscaldare nel forno a microonde (circa 2-3 minuti) per sciogliere l'agarosio;
- Aggiungere 2 gocce di etidio bromuro per raggiungere una concentrazione finale di 0,5 µg/ml;
- Trasferire la soluzione ancora calda nell'attrezzatura di raffreddamento;
- Attendere che il gel solidifichi.

3. Elettroforesi su gel

- Trasferire il gel di agarosio nell'apparecchio di elettroforesi e immergere in tampone di TAE 1 ×
- Caricare 20 µl di ciascun campione in un pozzetto separato, aggiungendo un marcatore di peso molecolare (scala di DNA di 100bp, Promega) in un pozzetto a parte.
- Effettuare l'elettroforesi su gel a 120 V per 30-45 minuti.

4. Visualizzazione dei prodotti dell'amplificazione

Se l'etidio bromuro è stato incorporato nel gel di agarosio come descritto in precedenza, i prodotti del DNA sono visualizzati sotto una fonte di raggi UV. Alternativamente, il gel di agarosio è colorato coprendo il gel in una soluzione diluita di etidio bromuro (0,5 µg/ml in acqua) per 30 minuti prima della visualizzazione.

Appendice 11

Orientamenti per la procedura di fecondazione artificiale dello spinarello

La presente sezione descrive la procedura per ottenere uova fecondate di spinarello al fine del loro utilizzo nella prova sullo sviluppo sessuale.

Procedure

Raccolta di sperma nei maschi

1. Sopprimere in modo incruento un esemplare maschio dai bei colori della popolazione desiderata
2. Recidere i testicoli da ciascun lato del pesce. *I testicoli sono generalmente molto pigmentati, di forma cilindrica facilmente visibili dalla linea mediana laterale del corpo.* Utilizzare uno dei seguenti metodi:
 3. Con un paio di forbicine, iniziare dalla cloaca e fare un'incisione di 1-1,5 cm con un unico taglio a 45°.
 4. Utilizzare il bisturi per fare una piccola incisione sul lato del pesce leggermente posteriore al pelvis e in posizione leggermente ventrale rispetto alle placche laterali
 5. Rimuovere i testicoli vanno rimossi mediante piccole forcipi e collocati in un piatto di Petri.
 6. Ricoprire ciascun testicolo con 100 µl di **soluzione finale di Hank** (*) preparata di recente.
 7. Con una lametta da rasoio o un bisturi tagliare a piccoli cubetti i testicoli. Verrà così liberato dello sperma che darà alla soluzione di Hank un aspetto lattiginoso.
 8. Inserire il fluido contenente lo sperma in una provetta, avendo grande cura di non introdurre pezzetti di tessuto testicolare durante il pipettaggio.
 9. Aggiungere 800 µl di soluzione finale di Hank nella provetta e mescolare accuratamente.
 10. Se necessario, il maschio può essere conservato fissandolo in etanolo al 100 % o altro prodotto di fissaggio. Ciò è particolarmente importante se lo studio mira ad attribuire l'origine parentale alla progenie.

(*) Soluzione salina tamponata di Hank (HBSS)

La soluzione HBSS è necessaria per conservare lo sperma in vista di una fecondazione.

Nota importante: *Sebbene la maggior parte delle soluzioni madre prescritte possano essere preparate in anticipo, lo stock n. 5 e successivamente la soluzione finale vanno preparati lo stesso giorno in cui saranno usati.*

Stock n. 1

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Acqua distillata	100 ml

Stock n. 2

Na ₂ HPO ₄ (anidro)	0,358 g
KH ₂ PO ₄	0,60 g
Acqua distillata	100 ml

Stock n. 3

CaCl ₂	0,72 g
Acqua distillata	50 ml

Stock n. 4

MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,23 g
Acqua distillata	50 ml

Stock n. 5 (preparare al momento dell'uso)

NaHCO ₃	0,35 g.
Acqua distillata	10 ml

Nota: Se sono già disponibili alcuni dei sali sopra indicati, ma con un diverso tenore di acqua (ad es. 2H₂O anziché in forma anidra), essi possono essere utilizzati avendo l'accortezza di adeguarne il peso in funzione del peso molecolare.

Ai fini della soluzione finale di Hank, combinare i componenti nel modo seguente:

Stock 1	1,0 ml
Stock 2	0,1 ml
Stock 3	0,1 ml
Acqua distillata	8,6 ml
Stock 4	0,1 ml
Stock 5	0,1 ml

Mescolare bene prima dell'uso

Fecondazione

- Individuare le femmine grandi e gravide nella popolazione desiderata; le femmine sono pronte per essere compresse solo quando le uova sporgono visibilmente dalla cloaca. Le femmine "pronte" adottano la caratteristica posizione a testa alta.
- Passare delicatamente un dito o il pollice lungo il fianco del pesce verso la coda per facilitare l'espulsione di un pacchetto di uova in una piastra di Petri pulita. Ripetere l'operazione sull'altro fianco e rimettere il pesce nella sua vasca.
- Le uova possono essere sparse (a formare un unico strato) utilizzando un pennello fine. È importante cercare di esporre il maggior numero di uova allo sperma e di massimizzare la superficie delle uova a contatto con lo sperma. Nota importante: Mantenere le uova umide avvolgendole in un panno umido (è importante che le uova non siano a diretto contatto con l'acqua, poiché ciò potrebbe indurre prematuramente il corio impedendo la fecondazione). Vi sono significative variazioni nel numero di uova che una femmina può produrre, ma in media si possono ottenere circa 150 uova da una sola femmina gravida.
- Stendere uniformemente 25 µl di sperma nella miscela di Hank sull'intera superficie delle uova usando un pennello. Le uova si induriranno rapidamente e cambieranno colore (nell'arco di un minuto) quando comincia la fecondazione. Se il numero stimato di uova è superiore a 150, ripetere la procedura. Analogamente, se le uova non si induriscono nell'arco di un minuto, aggiungere ancora un po' di sperma. Nota importante: L'aggiunta di sperma non migliora necessariamente il tasso di fecondazione.
- Lasciare "interagire" le uova e la soluzione dello sperma per almeno 15 minuti e le uova fecondate vanno collocate nelle vasche in cui ha luogo l'esposizione alla sostanza chimica di prova entro 90 minuti dalla fecondazione.
- Ripetere la procedura con un'altra femmina finché sarà raccolto un numero di uova sufficiente.
- Preservare alcune uova dell'ultimo lotto e fissarle in acido acetico al 10 %.

Conteggio e distribuzione delle uova nelle vasche sperimentali

1. Distribuire le uova equamente tra ciascun gruppo di trattamento per evitare distorsioni genetiche. Suddividere ciascun lotto di uova fecondate in gruppi di pari dimensioni (in numero pari a quello dei gruppi di trattamento) utilizzando uno strumento smussato (ad esempio una pinzetta piatta per entomologia o un'ansa di inoculazione). Se l'obiettivo è quello avere 4 repliche per trattamento, contenenti ciascuna 20 uova, è necessario distribuire 80 uova per vasca di esposizione. **Nota importante:** Si consiglia di aggiungere il 20 % di uova in più (cioè 96 uova per gruppo di trattamento) fino a quando non si abbia la certezza di aver raggiunto un tasso di fecondazione del 100 %.
2. Le uova di spinarello sono spesso soggette a infezioni fungine al di fuori del nido tutelato dal padre. A tale riguardo, il trattamento di tutte le uova con il blu di metilene durante i primi 5 giorni della prova è estremamente importante. Aggiungere una soluzione madre di blu di metilene preparato ad 1 mg/ml nelle vasche di esposizione per ottenere una concentrazione finale non superiore a 2,125 mg/l. **Nota importante:** Gli spinarelli non vanno esposti al blu di metilene dopo la schiusa, di modo che il sistema dovrebbe essere privo di metilene entro il 6° giorno.
3. Ispezionare le uova tutti i giorni e registrare come tali le uova morte o non fecondate. **Nota importante:** Le uova non devono mai rimanere fuori dall'acqua fino alla schiusa, nemmeno per brevi periodi.

C.42 BIODEGRADABILITÀ NELL'ACQUA DI MARE**INTRODUZIONE GENERALE**

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 306 (1992). Quando sono stati messi a punto i primi metodi di prova, non si sapeva ancora in che misura si potessero applicare all'ambiente marino i risultati delle prove di screening per la pronta biodegradabilità che utilizzano acqua dolce e inoculi costituiti da effluenti secondari di stazioni di depurazione o di fanghi attivi. Su questo aspetto si sono registrati risultati variabili (ad es. (1)).
2. Molti effluenti industriali, contenenti varie sostanze chimiche, arrivano al mare per sversamento diretto o tramite estuari e fiumi in cui i tempi di permanenza sono ridotti rispetto al tempo necessario per la biodegradazione totale di molte delle sostanze chimiche presenti. La crescente consapevolezza della necessità di proteggere l'ambiente marino da carichi sempre maggiori di sostanze chimiche e di stimare la concentrazione probabile delle sostanze chimiche nel mare ha portato allo sviluppo di metodi di prova per la biodegradabilità nell'acqua di mare.
3. I metodi qui descritti utilizzano l'acqua di mare naturale in quanto fase acquosa e come fonte di microrganismi. Al fine di conformarsi ai metodi di pronta biodegradabilità in acqua dolce, è stata esaminata la possibilità di utilizzare acqua di mare ultrafiltrata e centrifugata, nonché sedimenti marini come inoculi. Queste ricerche non hanno portato a nessun risultato. Il mezzo di prova è dunque costituito da acqua di mare naturale pretrattata in modo da eliminare le particelle più grosse.
4. Al fine di valutare la biodegradabilità ultima con il metodo del dibattimento in pallone (noto come metodo "shake flask"), occorre utilizzare concentrazioni relativamente elevate della sostanza in esame a causa della scarsa sensibilità del metodo di analisi del carbonio organico disiolto (DOC). A tal fine occorre aggiungere all'acqua di mare sostanze nutritive minerali (N e P), altrimenti la loro debole concentrazione limiterebbe l'eliminazione del DOC. Nel metodo detto della "bottiglia chiusa", occorre inoltre aggiungere le sostanze nutritive per via della concentrazione della sostanza in esame aggiunta.
5. Questi metodi non sono prove destinate a testare la pronta biodegradabilità in quanto non vengono aggiunti inoculi oltre ai microorganismi già presenti nell'acqua di mare. Queste prove non simulano neanche l'ambiente marino, in quanto vengono aggiunte sostanze nutritive e la concentrazione della sostanza in esame è molto più elevata di quella rilevata in mare. Per questi motivi viene proposto di classificare questi metodi in una nuova sezione intitolata "Biodegradabilità nell'acqua di mare".

APPLICAZIONE

6. I risultati delle prove, effettuate perché le condizioni di utilizzo e di smaltimento della sostanza in questione indicavano un suo convogliamento verso il mare, danno una prima indicazione della biodegradabilità nell'acqua di mare. Se il risultato è positivo (eliminazione del DOC > 70 %; domanda teorica di ossigeno (ThOD) > 60 %), se ne può dedurre che il prodotto potrebbe subire una biodegradazione nell'ambiente marino. Un risultato negativo, tuttavia, non consente di escludere una tale eventualità, ma indica che occorrono studi supplementari utilizzando, ad esempio, la concentrazione più bassa possibile della sostanza in esame.
7. In entrambi i casi, se occorre un valore più preciso del tasso o del grado di biodegradazione nell'acqua di mare in un punto preciso, sarà necessario ricorrere ad altri metodi più complessi e sofisticati, e dunque più costosi. Si potrebbe ad esempio effettuare un test di simulazione utilizzando una concentrazione della sostanza in esame più vicina alla concentrazione probabile nell'ambiente. Si potrebbe anche utilizzare acqua di mare non fortificata né pretrattata, prelevata dal sito di interesse, e la biodegradazione primaria potrebbe essere seguita da analisi chimiche specifiche. Per la biodegradabilità ultima sarebbe necessario utilizzare sostanze marcate con ¹⁴C in modo da poter misurare i tassi di scomparsa del ¹⁴C organico solubile e la formazione di ¹⁴CO₂ a concentrazioni realistiche rispetto a quelle effettivamente presenti nell'ambiente.

SCELTA DEI METODI

8. La scelta del metodo da utilizzare dipende da una serie di fattori; la tabella riportata qui di seguito mira a fornire delle indicazioni in merito. Le sostanze la cui solubilità in acqua è inferiore a circa 5 mg/l di C non possono essere testate col metodo del dibattimento in pallone, ma (in linea di massima) le sostanze scarsamente solubili possono essere testate col metodo della bottiglia chiusa.

Tabella

Vantaggi e inconvenienti dei metodi del dibattimento in pallone (*shake flask*) e della bottiglia chiusa

METODO	VANTAGGI	INCONVENIENTI
DIBATTIMENTO IN PALLONE	<ul style="list-style-type: none"> — apparecchiatura semplice, eccetto l'analizzatore di C — una durata di 60 giorni non costituisce un problema — nessuna interferenza con la nitrificazione — può essere adattato per le sostanze volatili 	<ul style="list-style-type: none"> — richiede un analizzatore di C — utilizzi di 5-40 mg/l di DOC potrebbero risultare inibitori — la determinazione del DOC è difficile a basse concentrazioni nell'acqua di mare ("effetto cloruro") — il DOC a volte è elevato nell'acqua di mare
BOTTIGLIA CHIUSA	<ul style="list-style-type: none"> — apparecchiatura semplice — determinazione finale semplice — si utilizza la sostanza in esame a basse concentrazioni (2 mg/l) il che riduce i rischi di inibizione — facilmente adattabile alle sostanze volatili 	<ul style="list-style-type: none"> — potrebbe risultare difficile mantenere l'ermeticità delle bottiglie (o "matracci") — la crescita dei batteri sulle pareti può falsare i risultati — i valori del consumo di O₂ della prova in bianco possono essere elevati, in particolare dopo 28 giorni; si può ovviare a questo inconveniente facendo invecchiare l'acqua di mare — possibile interferenza con il consumo di O₂ dovuta alla nitrificazione

METODO DEL DIBATTIMENTO IN PALLONE (SHAKE FLASK)

INTRODUZIONE

1. Questo metodo è una variante per l'acqua di mare del metodo di screening modificato dell'OCSE di cui al capitolo C.4B del presente allegato (2). È stato messo a punto a seguito di prove interlaboratorio (*ring test*) effettuate per la Commissione europea dall'Istituto danese della qualità dell'acqua (3).
2. Come per il metodo della bottiglia chiusa in ambiente marino, i risultati di questa prova non devono essere considerati indicatori di una pronta biodegradabilità, ma essere utilizzati specificatamente per ottenere informazioni sulla biodegradabilità delle sostanze negli ambienti marini.

PRINCIPIO DELLA PROVA

3. Una quantità predeterminata della sostanza in esame è disciolta nel mezzo di prova per ottenere una concentrazione di carbonio organico disiolto (DOC) compresa tra 5 e 40 mg/l. Se si migliorano i limiti di sensibilità delle analisi del carbonio organico, può essere vantaggioso utilizzare concentrazioni inferiori della sostanza in esame, in particolare nel caso di sostanze inibitorie. La soluzione della sostanza in esame nel mezzo di prova è incubata in un incubatore con agitazione, al buio o in condizioni di luce diffusa a una temperatura stabilita (controllata a ± 2 °C) di norma compresa tra 15 e 20 °C. Qualora l'obiettivo dello studio sia simulare situazioni ambientali reali, le prove possono essere effettuate al di fuori di questo intervallo normale di temperature. La durata massima raccomandata della prova è 60 giorni. La degradazione è seguita da misurazioni del DOC (degradazione ultima) e in alcuni casi da analisi specifiche (degradazione primaria).

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

4. Per sapere se questa prova può essere utilizzata per una determinata sostanza, occorre conoscere alcune delle sue proprietà. Il tenore di carbonio organico della sostanza deve essere noto, la sua volatilità deve essere tale da non dar luogo a perdite significative nel corso della prova, la sua solubilità in acqua dovrebbe essere superiore ad un valore equivalente a 25-40 mg/l di C. La sostanza in esame inoltre non dovrebbe adsorbirsi in modo significativo sulle superfici di vetro. Per poter interpretare i risultati ottenuti, soprattutto se sono vicini ai valori "soglia", occorre disporre di informazioni sulla purezza o le proporzioni relative dei principali componenti della sostanza in esame.

5. Per la scelta delle concentrazioni da sottoporre a prova e per interpretare correttamente i valori di biodegradazione bassi, possono essere utili informazioni sulla tossicità della sostanza in esame per i batteri, rilevate ad esempio in prove a breve termine sul tasso di respirazione (4). Tuttavia, queste informazioni non sono sempre sufficienti per interpretare correttamente i risultati ottenuti nella prova di biodegradazione e, in questo senso, la procedura descritta al paragrafo 18 è più adeguata.

SOSTANZE DI RIFERIMENTO

6. Per controllare l'attività microbica del campione di acqua di mare, si devono utilizzare sostanze di riferimento adeguate. Il benzoato di sodio, l'acetato di sodio e l'anilina sono sostanze che possono essere utilizzate a tal fine. Le sostanze di riferimento devono degradarsi in un arco di tempo ragionevolmente breve, altrimenti si raccomanda di rincominciare la prova utilizzando un altro campione di acqua di mare.
7. Nelle prove interlaboratorio CE in cui i campioni di acqua di mare sono stati raccolti in luoghi diversi e in periodi diversi dell'anno (3), la fase di latenza (t_L) e il tempo necessario (successivamente alla fase di latenza) per raggiungere il 50 % di degradazione (t_{50}) erano per il benzoato di sodio da 1 a 4 giorni e da 1 a 7 giorni rispettivamente. Per l'anilina i valori erano compresi tra 0 e 10 giorni per la t_L e tra 1 e 10 giorni per la t_{50} .

RIPRODUCIBILITÀ E SENSIBILITÀ DEL METODO

8. La riproducibilità del metodo è stata stabilita nelle prove interlaboratorio (3). La concentrazione più bassa della sostanza in esame, per la quale questo metodo può essere utilizzato con l'analisi del DOC, è determinata in ampia misura dal limite di rivelabilità dell'analisi del carbonio organico (attualmente 0,5 mg/l di C) e dalla concentrazione del carbonio organico disiolto dell'acqua di mare utilizzata (di norma tra 3 e 5 mg/l per l'acqua in mare aperto). La concentrazione di base del DOC non deve superare il 20 % circa della concentrazione totale del DOC dopo l'aggiunta della sostanza in esame. Qualora ciò non sia possibile la concentrazione di base del DOC può eventualmente essere ridotta facendo invecchiare l'acqua di mare prima della prova. Se il metodo è utilizzato solo con un'analisi chimica specifica (che misura la degradazione primaria) il ricercatore deve comprovare, fornendo informazioni supplementari, se sia possibile conseguire la degradabilità ultima. Queste informazioni aggiuntive possono consistere nei risultati di altre prove di pronta o intrinseca biodegradabilità.

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiatura

9. Normale apparecchiatura da laboratorio e:
- un agitatore che possa contenere matracci di Erlenmeyer di 0,5-2 litri, dotato di un dispositivo di controllo della temperatura o utilizzato in un locale a temperatura costante tra 15 e 20 °C con un'escursione termica massima di ± 2 °C;
 - matracci di Erlenmeyer di 0,5-2 litri, a collo stretto;
 - apparecchio di filtrazione su membrana o centrifuga;
 - membrane filtranti di 0,2-0,45µm;
 - analizzatore di carbonio;
 - apparecchiature per analisi specifiche (facoltativo).

Acqua di mare

10. Prelevare un campione di acqua con un contenitore perfettamente pulito e trasportarlo in laboratorio, preferibilmente entro 1 o 2 giorni dal prelievo. Nel corso del trasporto bisogna fare in modo che la temperatura del campione non superi eccessivamente la temperatura stabilita per la prova. Occorre identificare attentamente la località del campionamento, descrivendone lo status in termini di inquinamento e di sostanze nutritive. Per le acque costiere in particolare, occorre includere nella caratterizzazione il conteggio delle colonie batteriche eterotrofiche e la determinazione delle concentrazioni di nitrato, ammonio e fosfato disiolto.

11. Per il campione di acqua di mare, occorre fornire le informazioni seguenti:
 - data di prelievo;
 - profondità del prelievo;
 - aspetto del campione — torbidità ecc.;
 - temperatura al momento del prelievo;
 - salinità;
 - DOC;
 - tempo trascorso tra il prelievo e l'utilizzo nella prova.
12. Se si rileva che il tenore di DOC del campione di acqua di mare è elevato (paragrafo 8), si raccomanda di far invecchiare questo campione per circa una settimana prima del suo utilizzo. L'invecchiamento avviene conservando il campione in condizioni aerobiche alla temperatura di prova, al buio o alla luce diffusa. Se necessario, occorre mantenere le condizioni aerobiche mediante una leggera aerazione. Nel corso dell'invecchiamento, il tenore di materia organica facilmente degradabile diminuisce. Nelle prove interlaboratorio (3), non è stata rilevata nessuna differenza tra il potenziale di degradazione dei campioni di acqua mare invecchiata e quello dei campioni appena raccolti. Prima di utilizzarla, pretrattare l'acqua di mare per eliminare le particelle più grossolane, ad esempio per filtrazione mediante un filtro di nylon o di carta a grana grossa (ma non membrane filtranti o filtri GF/C) o mediante sedimentazione e decantazione. La procedura utilizzata deve essere indicata nella relazione. Se si effettua il pretrattamento, occorre effettuarlo dopo l'invecchiamento.

Soluzioni madre di nutrienti minerali

13. Preparare le soluzioni madre seguenti utilizzando reagenti di grado analitico:
 - a) Diodrogenoortofosfato di potassio (Fosfato monopotassico), KH_2PO_4 8,50 g
Idrogenoortofosfato di potassio, K_2HPO_4 21,75 g
Sodio idrogenofosfato diidrato, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 33,30 g
Cloruro di ammonio, NH_4Cl 0,50 g
Sciogliere e portare il volume a 1 litro con acqua distillata.
 - b) Cloruro di calcio, CaCl_2 27,50 g
Sciogliere e portare il volume a 1 litro con acqua distillata.
 - c) Solfato di magnesio eptaidrato $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22,50 g
Sciogliere e portare il volume a 1 litro con acqua distillata.
 - d) Cloruro di ferro (III) esaidsrato, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g
Sciogliere e portare il volume a 1 litro con acqua distillata.

Si può evitare la precipitazione della soluzione d) aggiungendo una goccia di HCl concentrato o 0,4 g di acido etilendiamminotetra-acetico (sale disodico dell'EDTA) per litro. Se in una soluzione madre si forma un precipitato, occorre sostituirlo con una soluzione appena preparata.

Preparazione del mezzo di prova

14. Aggiungere 1 ml di ciascuna delle succitate soluzioni madre per litro di acqua di mare pretrattata.

Inoculo

15. Non aggiungere un inoculo specifico oltre ai microorganismi già presenti nell'acqua di mare. Determinare (facoltativo) il numero di eterotrofi che costituiscono delle colonie nel mezzo di prova contenente l'acqua di mare (e preferibilmente anche nei campioni di acqua di mare di partenza), ad esempio mediante conteggio su piastra, utilizzando agar marino. Questa procedura è particolarmente indicata per i campioni provenienti da aree costiere o inquinate. Controllare l'attività microbica eterotrofa nell'acqua di mare effettuando una prova con una sostanza di riferimento.

Preparazione dei matracci

16. Accertarsi che la vetreria da laboratorio sia perfettamente pulita, ma non necessariamente sterile (utilizzando per esempio acido cloridrico alcolico), sciacquarla e asciugarla prima dell'utilizzo al fine di evitare qualsiasi contaminazione con residui di prove precedenti. I matracci nuovi devono essere lavati prima di utilizzarli per la prima volta.
17. Esaminare le sostanze in esame in due matracci simultaneamente e la sostanza di riferimento in un unico matraccio. Effettuare una prova in bianco in doppio, senza sostanza in esame né sostanza di riferimento per la determinazione dei bianchi analitici. Disciogliere le sostanze in esame nel mezzo di prova — possono essere facilmente aggiunte mediante una soluzione madre concentrata — in modo da ottenere concentrazioni di partenza che si situano tra 5 e 40 mg/l di DOC. La sostanza di riferimento deve di norma essere testata ad una concentrazione di partenza di 20 mg/l di DOC. Se si utilizzano soluzioni madre di sostanze di prova e/o di riferimento, occorre accertarsi che la salinità del mezzo contenente acqua di mare non sia stato eccessivamente modificato.
18. Se si prevedono o non si possono escludere effetti tossici, può essere utile includere nel disegno sperimentale un esperimento sull'inibizione in doppio. A tal fine, aggiungere le sostanze in esame e di riferimento nello stesso recipiente; la concentrazione della sostanza di riferimento è di norma quella utilizzata nella prova di controllo (ossia 20 mg/l di DOC).
19. Versare quantità adeguate di soluzioni di prova nei matracci Erlenmeyer (fino a circa metà del volume del matraccio è una quantità adeguata) e successivamente ricoprire ciascun matraccio ma non ermeticamente (ad esempio con un foglio di alluminio) in modo da consentire gli scambi gassosi tra il matraccio e l'aria circostante. (I tamponi di cotone non sono indicati se si utilizza l'analisi del DOC). Riporre i recipienti sull'agitatore e agitare in modo continuo a velocità ridotta (100 giri/min.) per l'intera durata della prova. Mantenere la temperatura costante (tra 15 e 20 °C e entro ± 2 °C) e proteggere i recipienti dalla luce al fine di evitare la proliferazione di alghe. Accertarsi che l'aria non contenga materie tossiche.

Prova fisico-chimica di controllo (facoltativa)

20. Se si prevedono una degradazione abiotica o meccanismi di perdita, come l'idrolisi (problema che sorge solo in caso di analisi specifiche), la volatilizzazione o l'adsorbimento, è auspicabile effettuare un esperimento fisico-chimico di controllo, aggiungendo ad esempio cloruro di mercurio (II)(HgCl₂) ⁽¹⁾ (50-100 mg/l) nei recipienti contenenti la sostanza in esame al fine di porre fine all'attività microbica. Una diminuzione importante del DOC o della concentrazione di una sostanza specifica nella prova fisico-chimica di controllo indica la presenza di meccanismi di degradazione abiotica. (Se si utilizza cloruro di mercurio, occorre prestare attenzione alle interferenze o all'avvelenamento catalitico nell'analisi del DOC).

Numero di matracci

21. In una prova tipo si utilizzano i matracci seguenti:

Matracci 1 & 2 contengono la sostanza in esame (sospensione di prova);

Matracci 3 & 4 contengono solo l'acqua di mare (prova in bianco)

Matraccio 5 contiene la sostanza di riferimento (controllo);

Matraccio 6 contiene la sostanza di prova e di riferimento (controllo di tossicità) - facoltativo;

Matraccio 7 contiene la sostanza di prova e l'agente sterilizzante (controllo sterile abiotico) - facoltativo.

Analisi del DOC

22. Nel corso della prova, occorre prelevare campioni ad intervalli adeguati per l'analisi del DOC (Appendice 1). Prelevare sempre campioni all'inizio (giorno 0) e alla fine della prova (giorno 60). Al fine di tracciare la curva della degradazione in funzione del tempo, è necessario disporre di almeno cinque campioni in tutto. Non è possibile stabilire un calendario preciso per il campionamento dato che il tasso di biodegradazione varia. Occorre effettuare la determinazione del DOC due volte su ciascun campione.

⁽¹⁾ Il cloruro di mercurio (II) (HgCl₂) è una sostanza estremamente tossica che deve essere maneggiata con le dovute precauzioni. I rifiuti liquidi contenenti questa sostanza chimica devono essere smaltiti in modo adeguato, e non essere riversati nel sistema di fognature.

Campionamento

23. Il volume dei campioni dipende dal metodo analitico (analisi specifica), dall'analizzatore di carbonio utilizzato e dalla procedura (membrana filtrante o centrifuga) scelti per il trattamento del campione prima della determinazione del carbonio (paragrafi 25 e 26). Prima del campionamento, accertarsi che il mezzo di prova sia adeguatamente miscelato e che i materiali che aderiscono alle pareti del matraccio siano sciolti o rimessi in sospensione.
24. Subito dopo il campionamento, occorre effettuare la filtrazione con membrana o centrifuga. Se necessario, conservare i campioni filtrati o centrifugati tra 2 e 4 °C per un massimo di 48 ore o a -18 °C per periodi più lunghi (se si ha la certezza che la sostanza non ne risentirà, acidificare a pH 2 prima dello stoccaggio).
25. Le membrane filtranti (0,2 - 0,45 µm), ad es. le membrane filtranti al policarbonato, sono adeguate se si ha la certezza che non rilasciano carbonio né assorbono la sostanza nel corso della filtrazione. Alcune membrane filtranti sono impregnate di tensioattivi per l'idrofilizzazione e possono rilasciare quantità considerevoli di carbonio disiolto. Preparare questi filtri facendoli bollire in acqua deionizzata per tre periodi consecutivi di 1 ora ciascuno. Dopo questa operazione, conservare i filtri in acqua deionizzata. Eliminare i primi 20 ml di filtrato.
26. Al posto della filtrazione con membrana si può ricorrere alla centrifugazione dei campioni. Centrifugare a 40 000 m.s⁻² (~ 4 000 g) per 15 minuti, preferibilmente in una centrifuga refrigerata.

Nota: La differenziazione del TOC rispetto al DOC mediante centrifuga per le concentrazioni estremamente basse sembra non funzionare, in quanto non tutti i batteri sono eliminati o il carbonio che fa parte del plasma batterico è nuovamente disiolto. A concentrazioni di prova più elevate (> 10 mg C per litro), l'errore di centrifugazione sembra relativamente ridotto.

Frequenza dei campionamenti

27. Se le analisi sono effettuate immediatamente dopo il prelievo del campione, determinare il momento del prelievo successivo alla luce del risultato della determinazione analitica.
28. Se i campioni sono conservati per ulteriori analisi (paragrafo 24) occorre prelevarne più di cinque (numero minimo). Analizzando in primo luogo gli ultimi campioni, poi dei campioni adeguatamente scelti tornando "indietro" verso l'inizio, è possibile ottenere una corretta descrizione della curva di biodegradazione con un numero di determinazioni analitiche relativamente ridotto. Se entro la fine della prova non si è verificata nessuna degradazione, non occorre analizzare altri campioni, e in tal caso la strategia "all'indietro" può consentire di risparmiare una parte considerevole dei costi di analisi.
29. Se sulla curva di degradazione si osserva un plateau prima del 60simo giorno occorre porre fine alla prova. Se la degradazione è paleamente iniziata entro il 60simo giorno ma non ha raggiunto il plateau, occorre prolungare la prova.

DATI E RELAZIONI

Trattamento dei risultati

30. Riportare i risultati analitici sulla scheda dati allegata (Appendice 2) e calcolare i valori della biodegradazione sia per le sostanze in esame che per quelle di riferimento con l'equazione:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

dove:

- D_t = degradazione in percentuale del DOC o eliminazione di una sostanza specifica al tempo t,
- C_0 = concentrazione iniziale del DOC o di una sostanza specifica nel mezzo di prova,
- C_t = concentrazione del DOC o di una sostanza specifica nel mezzo di prova al tempo t,
- $C_{bl(0)}$ = concentrazione iniziale del DOC o di una sostanza specifica nella prova in bianco,
- $C_{bl(t)}$ = concentrazione del DOC o di una sostanza specifica nella prova in bianco al tempo t.

31. Esprimere la degradazione come la percentuale di eliminazione del DOC (degradazione ultima) o di una sostanza specifica (degradazione primaria) al tempo t . Calcolare le concentrazioni del DOC arrotondando allo 0,1 mg/l più vicino e arrotondare le medie dei valori D_t al valore percentuale intero più vicino.
32. Tracciare su un diagramma la curva di degradazione in funzione del tempo come indicato nella figura di cui alla sezione "Validità e interpretazione dei risultati". Se esistono dati sufficienti, a partire da questa curva calcolare la fase di latenza (t_L) e il tempo necessario per raggiungere il 50 % di eliminazione dopo la fase di latenza (t_{50}).

Relazione sulla prova

33. La relazione sulla prova deve contenere le informazioni seguenti:

Sostanza in esame:

- natura fisica e, se del caso, proprietà fisico-chimiche;
- dati identificativi.

Condizioni sperimentali:

- luogo di prelievo e descrizione del sito; stato dell'inquinamento e dei nutrienti (conteggio delle colonie, nitrato, ammonio, fosfato, se del caso);
- caratteristiche del campione: data di campionamento, profondità, aspetto, temperatura, salinità, DOC (facoltativo), tempo trascorso tra il prelievo e l'utilizzo nella prova;
- metodo (eventualmente) utilizzato per far invecchiare l'acqua di mare;
- metodo utilizzato per il pretrattamento (filtrazione/sedimentazione) dell'acqua di mare;
- metodo utilizzato per la determinazione del DOC;
- metodo utilizzato per l'analisi specifica (facoltativo);
- metodo utilizzato per stabilire il numero di eterotrofi nell'acqua di mare (metodo della conta in piastra o altra procedura) (facoltativo);
- altri metodi (facoltativo) utilizzati per caratterizzare l'acqua di mare (misurazioni ATP ecc.)

Risultati:

- dati analitici riportati su una scheda dati (Appendice 2);
- lo svolgimento della prova di degradazione è rappresentato graficamente con un diagramma che indica la fase di latenza (t_L), la pendenza e il tempo necessario (a partire dalla fine della fase di latenza) per raggiungere il 50 % di eliminazione (t_{50}). La fase di latenza può essere valutata graficamente come sulla figura nella sezione "Validità e interpretazione dei risultati" o più agevolmente può essere determinata come il tempo necessario per raggiungere il 10 % di degradazione;
- la percentuale di degradazione misurata dopo 60 giorni o alla fine della prova.

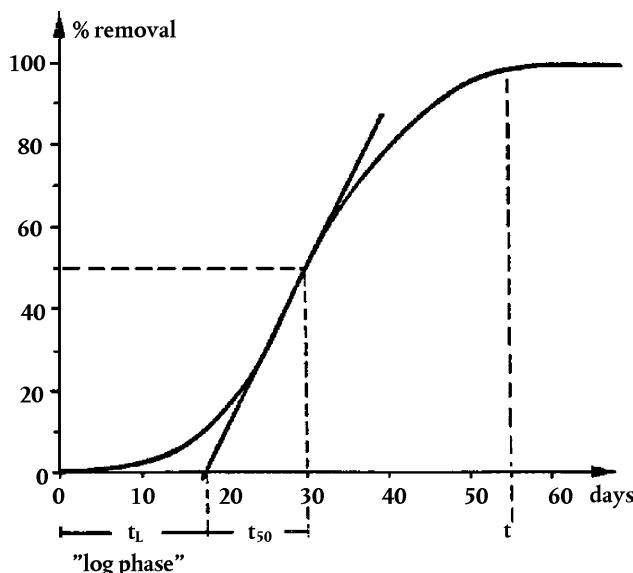
Discussione dei risultati.

Validità e interpretazione dei risultati

34. I risultati ottenuti con le sostanze di riferimento, a esempio il benzoato di sodio, l'acetato di sodio o l'anilina, devono essere comparabili ai risultati ottenuti nelle prove interlaboratorio (3) (cfr. paragrafo 7 della sezione "Sostanze di riferimento"). Se i risultati ottenuti con le sostanze di riferimento sono atipici, la prova deve essere ripetuta utilizzando un altro campione di acqua di mare. Anche se i risultati delle prove di inibizione non sono sempre facili da interpretare a causa del DOC apportato dalla sostanza in esame, una considerevole riduzione del tasso di eliminazione del DOC totale rispetto a quello del controllo, è un'indicazione della presenza di effetti tossici.

35. Date le concentrazioni di prova relativamente elevate rispetto a quelle della maggior parte dei sistemi naturali (e dunque la presenza di un rapporto sfavorevole tra le concentrazioni delle sostanze di prova e altre fonti di carbonio), il metodo deve essere considerato come una prova preliminare che può essere utilizzata per sapere se una sostanza è facilmente biodegradabile. Analogamente un risultato basso non significa necessariamente che la sostanza in esame non è biodegradabile in ambiente marino, ma indica che sono necessari ulteriori lavori per accertarsene.

Qui di seguito è riportato un esempio di un esperimento di degradazione teorica che illustra un metodo praticabile per ottenere i valori di t_L (durata della "fase di latenza") e t_{50} (intervallo di tempo, che inizia dopo t_L , necessari per conseguire il 50 % di eliminazione).



METODO DELLA BOTTIGLIA CHIUSA

INTRODUZIONE

- Questo metodo è una variante per l'acqua di mare del metodo della bottiglia chiusa (5) ed è stato messo a punto a seguito di una prova interlaboratorio organizzata per la Commissione europea dall'Istituto danese per la qualità dell'acqua (3).
- Come indicato per il metodo del dibattimento in pallone in ambiente marino, i risultati di questa prova non devono essere considerati indicatori di una pronta biodegradabilità ma devono essere utilizzati proprio per ottenere informazioni sulla biodegradabilità delle sostanze nell'ambiente marino.

PRINCIPIO DEL METODO

- Una quantità prestabilita di sostanza in esame viene disciolta nel mezzo di prova in modo da ottenere una concentrazione compresa tra 2 e 10 mg/l della sostanza in esame (possono essere utilizzate una o più concentrazioni). La soluzione è conservata al buio in una bottiglia piena e chiusa, a bagno maria o in un ambiente chiuso a temperatura costante controllata compresa tra 15 e 20 °C a ± 1 °C. Qualora l'obiettivo dello studio sia simulare situazioni ambientali reali, le prove possono essere effettuate al di fuori di questo intervallo di temperature, a condizione di disporre di mezzi adeguati per controllare la temperatura. La degradazione è seguita da analisi dell'ossigeno per un periodo di 28 giorni.
- Le prove interlaboratorio hanno evidenziato che se si prolunga la prova al di là di 28 giorni, nella maggior parte dei casi non si ottengono informazioni utili per via di gravi interferenze. I valori della domanda biologica di ossigeno (BOD) nella prova in bianco sono risultati estremamente elevati, probabilmente per via della crescita sulla parete, dovuto all'assenza di agitazione, e della nitrificazione. Pertanto la durata auspicata è di 28 giorni ma se il valore BOD della prova in bianco rimane entro il limite del 30 % (paragrafi 15 e 40), la prova potrebbe essere prolungata.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

5. Per sapere se questa prova può essere utilizzata per una determinata sostanza, occorre conoscere alcune delle sue proprietà. Per calcolare la domanda teorica di ossigeno occorre conoscere la formula bruta (cfr. appendice 3); altrimenti occorre determinare la domanda chimica di ossigeno (COD) della sostanza per utilizzarla come valore di riferimento. L'utilizzo del COD è meno efficace in quanto nella prova COD alcune sostanze non sono pienamente ossidate.
6. La solubilità della sostanza deve essere superiore o uguale a 2 mg/l anche se in linea di massima potrebbero essere testate sostanze meno solubili (mediante ultrasonicatione) e composti volatili. Per interpretare i risultati ottenuti, soprattutto se sono vicini ai valori "soglia", occorre disporre di informazioni sulla purezza o le proporzioni relative dei principali componenti della sostanza in esame.
7. Per la scelta delle concentrazioni delle prove possono essere molto utili informazioni sulla tossicità della sostanza in esame per i batteri, rilevate ad esempio in prove a breve termine sul tasso di respirazione; queste informazioni sono indispensabili per interpretare correttamente bassi valori di biodegradazione (4). Tuttavia, questi dati non sono sempre sufficienti per interpretare correttamente i risultati ottenuti nella prova di biodegradazione e la procedura descritta al paragrafo 27 è più adeguata.

SOSTANZE DI RIFERIMENTO

8. Per controllare l'attività microbica del campione di acqua di mare, si devono utilizzare sostanze di riferimento adeguate. Possono essere utilizzati l'anilina, l'acetato di sodio o il benzoato (ad esempio). Una degradazione di queste sostanze di almeno il 60 % (della ThOD) deve avvenire entro un termine relativamente breve, altrimenti si raccomanda di ripetere la prova utilizzando un altro campione di acqua di mare.
9. Nelle prove interlaboratorio CE, in cui i campioni di acqua di mare sono stati raccolti in diversi punti e in diversi periodi dell'anno, la fase di latenza (t_L) e il tempo necessario, dopo la fase di latenza, per conseguire il 50 % di degradazione (t_{50}) erano per il benzoato di sodio rispettivamente da 0 a 2 giorni e da 1 a 4 giorni. Per l'anilina, i valori erano compresi tra 0 e 7 giorni per la t_L e tra 2 e 12 giorni per la t_{50} .

RIPRODUCIBILITÀ

10. La riproducibilità di questi metodi è stata accertata nelle prove interlaboratorio CE (3).

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiatura

11. Normale attrezzatura da laboratorio e:
 - a) bottiglie per l'analisi del BOD di 250-300 ml con tappi di vetro o bottiglie dal collo stretto di 250 ml con tappi di vetro;
 - b) varie bottiglie da 2, 3 e 4 litri graduate per la preparazione dell'esperimento e per il riempimento delle bottiglie per il BOD;
 - c) un bagno maria o una stanza a temperatura costante per mantenere i recipienti a temperatura costante (± 1 °C) e al buio;
 - d) apparecchiatura per l'analisi dell'ossigeno disciolto;
 - e) membrane filtranti con porosità da 0,2 a 0,45 µm (facoltativo);
 - f) apparecchiatura per analisi specifica (facoltativo).

Acqua di mare

12. Raccogliere un campione di acqua in un recipiente perfettamente pulito e trasportarlo in laboratorio, preferibilmente entro 1 o 2 giorni dal prelievo. Nel corso del trasporto bisogna fare in modo che la temperatura del campione non superi eccessivamente la temperatura stabilita per la prova.
13. Occorre identificare attentamente la località di campionamento, descrivendone lo status in termini di inquinamento e di nutrienti. Per le acque costiere o inquinate in particolare, occorre includere nella caratterizzazione il conteggio delle colonie batteriche eterotrofe e la determinazione delle concentrazioni di nitrato, ammonio e fosfato disciolto.
14. Per il campione di acqua di mare, occorre fornire le informazioni seguenti:
 - data di prelievo;
 - profondità del prelievo;
 - aspetto del campione — torbidità ecc.;
 - temperatura al momento del prelievo;
 - salinità;
 - carbonio organico disciolto (DOC);
 - tempo trascorso tra il prelievo e l'utilizzo nella prova.
15. Se si rileva che il tenore di DOC del campione di acqua di mare è elevato o si ritiene che dopo 28 giorni il BOD del bianco supererebbe di oltre il 30 % quello delle sostanze di riferimento, si raccomanda di far invecchiare questo campione per circa una settimana prima del suo utilizzo.
16. Far invecchiare il campione conservandolo in condizioni aerobiche alla temperatura di prova e al buio o alla luce diffusa. Se necessario, mantenere le condizioni aerobiche mediante una leggera aerazione. Nel corso dell'invecchiamento, il tenore di materia organica facilmente degradabile diminuisce. Nelle prove interlaboratorio (3), non è stata rilevata nessuna differenza tra il potenziale di degradazione dei campioni di acqua invecchiata e quello dei campioni appena raccolti.
17. Prima di utilizzarla, pretrattare l'acqua di mare per eliminare le particelle più grossolane, ad esempio per filtrazione con un filtro di nylon o di carta a grana grossa (ma non membrane filtranti o filtri GF/C) o mediante sedimentazione e decantazione. Occorre segnalare la procedura utilizzata. Se il campione è sottoposto ad invecchiamento, occorre effettuare il pretrattamento dopo l'invecchiamento.

Soluzioni madre di nutrienti minerali

18. Preparare le soluzioni madre seguenti utilizzando reagenti di grado analitico:

a)	Diidrogenoortofosfato di potassio (Fosfato monopotassico), KH_2PO_4	8,50 g
	Idrogenoortofosfato di potassio, K_2HPO_4	21,75 g
	Sodio idrogenofosfato diidrato, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,30 g
	Cloruro di ammonio, NH_4Cl	0,50 g
	Sciogliere e portare il volume a 1 litro con acqua distillata.	
b)	Cloruro di calcio, CaCl_2	27,50 g
	Sciogliere e portare il volume a 1 litro con acqua distillata.	

- c) Solfato di magnesio epta'idrato, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 22,50 g
 Sciogliere e portare il volume a 1 litro con acqua distillata.
- d) Cloruro di ferro (III) esa'idrato, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,25 g
 Sciogliere e portare il volume a 1 litro con acqua distillata.

Si può evitare la precipitazione nella soluzione d) aggiungendo una goccia di HCl concentrato o 0,4 g di acido etilendiamminotetra-acetico (sale disodico dell'EDTA) per litro. Se in una soluzione madre si forma un precipitato, occorre sostituirlo con una soluzione appena preparata.

Preparazione del mezzo di prova

19. Aggiungere 1 ml di ognuna delle soluzioni madre succitate per litro di acqua di mare pretrattata. Saturare il mezzo con aria alla temperatura di prova, aerandolo con aria compressa pulita per circa 20 minuti. Determinare la concentrazione di ossigeno disciolto ai fini di controllo. Sul nomogramma allegato al presente metodo di prova si può leggere (Appendice 4) la concentrazione di saturazione dell'ossigeno disciolto in funzione della salinità e della temperatura.

Inoculo

20. Non aggiungere un inoculo specifico oltre ai microorganismi già presenti nell'acqua di mare. Determinare (facoltativo) il numero di eterotrofi che costituiscono delle colonie presenti nel mezzo di prova contenente acqua di mare (e preferibilmente anche nei campioni di acqua di mare di partenza), ad esempio mediante conteggio su piastra, utilizzando agar marino. Questa procedura è particolarmente indicata per i campioni provenienti da aree costiere o inquinate. Controllare l'attività microbica eterotrofa nell'acqua di mare effettuando una prova con una sostanza di riferimento.

Preparazione dei matracci

21. Effettuare tutte le manipolazioni necessarie ivi compreso l'invecchiamento e il pretrattamento dell'acqua di mare alla temperatura di prova stabilita, compresa tra 15 e 20 °C; tutta la vetreria da laboratorio deve essere pulita ma non sterile.
22. Per la determinazione del BOD delle sostanze di prova e di riferimento preparare gruppi di bottiglie per BOD in serie sperimentali simultanee. Effettuare tutte le analisi in bottiglie in doppio (prove in bianco, sostanze di riferimento e di prova), ossia preparare due bottiglie per ciascuna determinazione. Effettuare quattro analisi nei giorni 0, 5, 15 e 28 (quattro determinazioni). Per le analisi dell'ossigeno quattro determinazioni richiedono un totale di $3 \times 2 \times 4 = 24$ bottiglie (prove in bianco, sostanza di riferimento e di prova), ossia circa 8 litri di mezzo di prova (per una concentrazione della sostanza in esame).
23. Preparare soluzioni separate delle sostanze di prova e di riferimento in grandi matracci di volume adeguato (paragrafo 11) aggiungendo in primo luogo le sostanze di prova e di riferimento, direttamente o a partire da una soluzione madre concentrata, nei matracci di grandi dimensioni parzialmente riempiti. Aggiungere ulteriore mezzo di prova fino ad ottenere le concentrazioni finali auspicate. Se si utilizzano soluzioni madre di sostanze di prova e/o di riferimento, accertarsi che la salinità del mezzo non sia eccessivamente alterata.
24. Scegliere le concentrazioni delle sostanze di prova tenendo conto di:
- la solubilità dell'ossigeno disciolto nell'acqua di mare per la temperatura e la salinità scelte per la prova (cfr. il nomogramma allegato — Appendice 4);
 - il valore del BOD nella prova in bianco dell'acqua di mare; e
 - la biodegradabilità attesa della sostanza in esame.
25. Per una salinità di 32 per mille (acqua oceanica), la solubilità dell'ossigeno disciolto è di circa 8,1 mg/l a 15 °C e 7,4 a 20 °C. Il consumo di ossigeno dell'acqua di mare stessa (respirazione della prova in bianco) può arrivare a 2 mg O₂/l o più, se l'acqua di mare non è invecchiata. Per garantire che, dopo l'ossidazione della sostanza in esame, rimanga una concentrazione significativa di ossigeno, occorre utilizzare una concentrazione iniziale di circa 2-3 mg/l (a seconda della ThOD) per le sostanze che dovrebbero degradarsi completamente alle condizioni di prova (come le sostanze di riferimento). Le sostanze meno degradabili devono essere testate a concentrazioni superiori, fino a 10 mg/l, a condizione che ciò non comporti effetti tossici. Può risultare utile effettuare parallelamente delle prove a bassa (circa 2 mg/l) e a alta (circa 10 mg/l) concentrazione della sostanza in esame.

26. Parallelamente occorre allestire una prova in bianco per l'ossigeno, in matracci che non contengono né la sostanza di prova né quella di riferimento.
27. Per valutare gli effetti inibitori, occorre preparare in vari matracci di grandi dimensioni le serie di soluzioni seguenti (paragrafo 13):
 - a) 2 mg/l di una sostanza facilmente degradabile, ad esempio una delle sostanze di riferimento citate;
 - b) x mg/l della sostanza in esame (x di norma è uguale a 2);
 - c) 2 mg/l della sostanza facilmente degradabile più x mg/l della sostanza in esame.

Prova fisico-chimica di controllo (facoltativa)

28. Qualora si decida di svolgere analisi specifiche, è possibile effettuare un esperimento fisico-chimico-per verificare se la sostanza in esame è eliminata mediante meccanismi abiotici, come l'idrolisi o l'adsorbimento. Una prova fisico-chimica di controllo può essere effettuata aggiungendo cloruro di mercurio (II) ($HgCl_2$) (¹) (50-100 mg/l) nelle bottiglie in doppio contenenti la sostanza in esame al fine di porre fine all'attività microbica. Una notevole riduzione della concentrazione di una sostanza specifica nel corso della prova indica la presenza di meccanismi di eliminazione abiotici.

Numero di matracci BOD in serie di prove tipica

29. In una serie di prove tipica si utilizzano i matracci seguenti:
 - almeno 8 contenenti la sostanza in esame;
 - almeno 8 contenenti unicamente acqua di mare fortificata con sostanze nutritive;
 - almeno 8 contenenti la sostanza di riferimento e, laddove necessario,
 - 6 matracci contenenti le sostanze in esame e di riferimento (controllo della tossicità).

SVOLGIMENTO DEL METODO

30. Dopo la preparazione, travasare immediatamente ciascuna soluzione mediante un sifone immerso nel quarto inferiore (non fino in fondo) del matraccio di grandi dimensioni adeguato, per riempire il rispettivo gruppo di bottiglie del BOD. Misurare immediatamente l'ossigeno disciolto nei controlli di zero (tempo zero) (paragrafo 33) o conservarli per un'analisi chimica successiva mediante precipitazione con $MnCl_2$ (cloruro di (II) manganese) e $NaOH$ (idrossido di sodio).
31. Incubare le rimanenti bottiglie per l'analisi BOD in parallelo alla temperatura di prova (15-20 °C), al buio, ritirarle dalla zona di incubazione ad intervalli periodici (ad esempio dopo 5, 15 e 28 giorni almeno) e misurare la loro concentrazione di ossigeno disciolto (paragrafo 33).
32. I campioni destinati ad analisi specifiche (facoltative) sono filtrati su membrana (0,2-0,45 µm) o centrifugati per 15 minuti. Conservare a 2 — 4 °C per un massimo di 48 ore o a -18 °C per periodi più lunghi se non si effettua immediatamente l'analisi (se si ha la certezza che la sostanza non ne risentirà, acidificare fino al pH 2 prima dello stoccaggio).

Determinazione dell'ossigeno disciolto

33. Determinare la concentrazione di ossigeno disciolto utilizzando un metodo chimico o elettrochimico riconosciuto a livello nazionale o internazionale.

DATI E RELAZIONI

Trattamento dei risultati

34. Riportare i risultati analitici sulla scheda dati allegata (Appendice 5).

(¹) Il cloruro di mercurio (II) ($HgCl_2$) è una sostanza molto tossica da manipolare con le dovute precauzioni. I residui liquidi che contengono questa sostanza chimica devono essere smaltiti in modo adeguato; e non essere riversati nel sistema di acque di scarico.

35. Calcolare il BOD come la differenza tra la perdita di ossigeno tra una prova in bianco e una soluzione contenente la sostanza in esame alle condizioni di prova. Dividere la perdita netta di ossigeno per la concentrazione della sostanza (peso/volume) al fine di esprimere il BOD in mg di BOD/mg della sostanza in esame. La degradazione è calcolata dividendo il BOD sia, preferibilmente, per la domanda teorica di ossigeno (ThOD) sia per la domanda chimica di ossigeno (COD) ed è espressa sotto forma di percentuale (cfr. paragrafo 36).
36. Per ciascun tempo di campionamento, calcolare i valori della biodegradazione sia per le sostanze in esame che per quelle di riferimento utilizzando una delle equazioni seguenti:

$$\% \text{ biodegradazione} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg sostanza in esame}}{\text{mg ThOD}/\text{mg sostanza in esame}} \times 100$$

$$\% \text{ biodegradazione} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg sostanza in esame}}{\text{mg COD}/\text{mg sostanza in esame}} \times 100$$

dove:

ThOD = domanda teorica di ossigeno (per il calcolo vedi l'appendice 3)

COD = domanda chimica di ossigeno, determinata per via sperimentale.

Nota: A volte le due modalità di calcolo (percentuale del ThOD o percentuale del COD) non danno gli stessi risultati; è preferibile utilizzare la ThOD in quanto nell'analisi COD alcune sostanze non sono totalmente ossidate.

37. Tracciare graficamente su un diagramma l'andamento della prova di degradazione (cfr. l'esempio alla sezione "Validità e interpretazione dei risultati"). Se esistono dati sufficienti, dalla curva di biodegradazione calcolare la fase di latenza (t_L) e il tempo necessario per conseguire il 50 % di eliminazione dopo la fine della fase di latenza (t_{50}).
38. Se si effettua un'analisi specifica (facoltativa), la percentuale di degradazione primaria corrisponde alla percentuale di eliminazione della sostanza specifica nel corso della prova (corretta per il valore ottenuto nei bianchi analitici).

Relazione sulla prova

39. La relazione sulla prova deve contenere le informazioni seguenti:

Sostanza in esame:

- natura fisica e, se del caso, proprietà fisico-chimiche;
- dati identificativi.

Condizioni di prova:

- ubicazione e descrizione del sito di campionamento: stato dell'inquinamento e dei nutrienti (conta delle colonie, nitrato, ammonio, fosfato, se del caso);
- caratteristiche del campione (data e profondità del campionamento, aspetto, temperatura, salinità, COD (facoltativo), tempo trascorso tra il prelievo e l'utilizzo nella prova);
- metodo (eventualmente) utilizzato per far invecchiare l'acqua di mare;
- metodo utilizzato per il pretrattamento (filtrazione/sedimentazione) dell'acqua di mare;
- metodo utilizzato per la determinazione del COD (se effettuata);
- metodo utilizzato per le misurazioni dell'ossigeno;
- procedura di dispersione delle sostanze poco solubili alle condizioni di prova;
- metodo utilizzato per determinare il numero di batteri eterotrofi nell'acqua di mare (conteggio su piastra o procedura alternativa);

- metodo utilizzato per determinare il DOC nell'acqua di mare (facoltativo);
- metodo utilizzato per l'analisi specifica (facoltativo);
- altri metodi opzionali utilizzati per caratterizzare l'acqua di mare (misurazioni ATP ecc.).

Risultati:

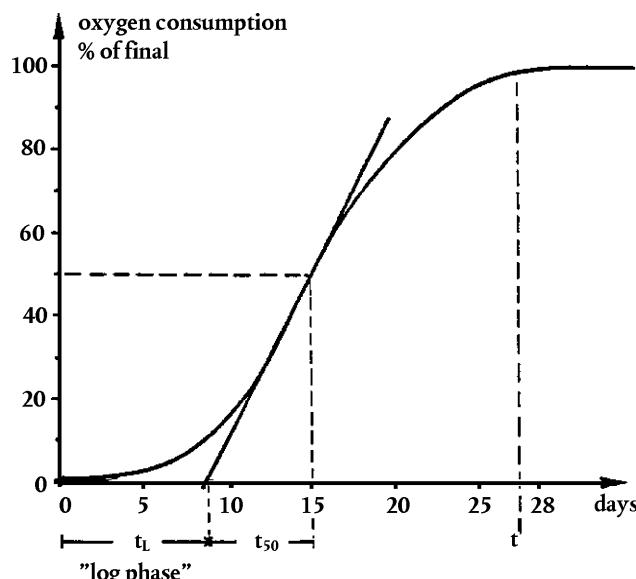
- dati analitici riportati su una scheda dati (vedi quella allegata all'appendice 5);
- la curva della prova di degradazione rappresentata su un diagramma che indica la fase di latenza (t_L), la pendenza e il tempo necessario (a partire dalla fine della fase di latenza) per raggiungere il 50 % del consumo finale di ossigeno dovuto all'ossidazione della sostanza in esame (t_{50}). La fase di latenza può essere valutata graficamente come sulla figura allegata o più agevolmente considerata come il tempo necessario per raggiungere il 10 % di degradazione;
- la percentuale di degradazione misurata dopo 28 giorni.

Discussione dei risultati.

Validità e interpretazione dei risultati

40. La respirazione della prova in bianco non deve superare 30 % dell'ossigeno consumato nella bottiglia di prova. Qualora non sia possibile conformarsi a questo criterio utilizzando acqua di mare appena raccolta, questa deve essere invecchiata (stabilizzata) prima dell'uso.
41. Occorre tener conto del fatto che le sostanze azotate possono incidere sui risultati.
42. I risultati ottenuti con le sostanze di riferimento (benzoato di sodio e anilina) dovrebbero essere paragonabili a quelli ottenuti con le prove interlaboratorio (3) (paragrafo 9). Se i risultati ottenuti con le sostanze di riferimento sono atipici, la prova deve essere ripetuta utilizzando un altro campione di acqua di mare.
43. Si può considerare che la sostanza in esame inibisce i batteri (alla concentrazione utilizzata) se il BOD della miscela di sostanze di prova e di riferimento è inferiore alla somma dei BOD delle soluzioni separate delle due sostanze.
44. Date le concentrazioni di prova relativamente elevate rispetto a quelle della maggior parte dei sistemi naturali e, dunque, di un rapporto sfavorevole tra le concentrazioni della sostanza in esame e altre fonti di carbonio, il metodo deve essere considerato una prova preliminare cui ricorrere per sapere se una sostanza è facilmente biodegradabile. In questo senso un risultato basso non significa necessariamente che la sostanza in esame non sia biodegradabile in ambiente marino, ma indica che occorreranno ulteriori esami per accertarsene.

Un esempio di esperimento di degradazione teorica che illustra un modo praticabile per stimare i valori di t_L (durata della "fase di latenza") e di t_{50} (intervallo di tempo — che inizia dopo t_L — necessario per conseguire il 50 % dell'assorbimento finale di ossigeno dovuto all'ossidazione della sostanza in esame) è riportato qui di seguito:



BIBLIOGRAFIA

- (1) de Kreuk J.F. and Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. *Chemosphere*, 10 (6); 561-573.
 - (2) Capitolo C.4-B del presente allegato: Determination of “Ready” Biodegradability Part IV Modified OECD Screening Test
 - (3) Nyholm N. and Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, March 1987, Commission of the European Communities.
 - (4) Capitolo C.11 del presente allegato: Biodegradation — Activated Sludge, Respiration Inhibition Test.
 - (5) Capitolo C.4-E del presente allegato: determinazione della “pronta biodegradabilità” Parte VI Prova della bottiglia chiusa.
-

Appendice 1

Determinazione del carbonio organico nell'acqua di mare

METODO DEL DIBATTIMENTO IN PALLONE

Per determinare il carbonio organico di un campione di acqua, si ossidano i composti organici di questo campione in diossido di carbonio, di norma utilizzando una delle tre tecniche seguenti:

- ossidazione a umido mediante persolfato/irradiazione UV;
- ossidazione a umido mediante persolfato/temperatura elevata (116-130 °C);
- combustione.

La quantità di CO₂ sviluppata è misurata mediante spettrometria a infrarossi o titrimetria. Oppure la CO₂ è ridotta in metano che viene dosato mediante un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID).

Il metodo persolfato/UV è comunemente utilizzato per l'analisi di acqua "pulita" a basso contenuto di particolato. Gli altri due metodi possono essere applicati alla maggior parte dei tipi di campioni di acqua, l'ossidazione mediante persolfato/temperatura elevata è più indicato per i campioni a ridotto tenore di carbonio organico, mentre la tecnica della combustione si applica ai campioni il cui tenore di carbonio organico non volatile (NVOC) è nettamente superiore a 1 mg/l di C.

Interferenze

Tutti e tre i metodi dipendono dall'eliminazione o la compensazione del carbonio inorganico (CI) presente nel campione. Il metodo più utilizzato per eliminare il CI consiste nello spurgo del CO₂ dal campione acidificato benché questa operazione comporti una perdita di composti organici volatili (1). L'eliminazione completa o la compensazione del CI deve essere effettuata per ogni matrice di campione e, in funzione del tipo campione, oltre al NVOC occorre determinare il carbonio organico volatile (VOC).

Concentrazioni elevate di cloruro comportano una riduzione dell'efficienza dell'ossidazione quando si ricorre al metodo persolfato/UV (2). Questa interferenza può tuttavia essere eliminata utilizzando un ossidante modificato con l'aggiunta di nitrato di mercurio (II). Quando si esaminano campioni contenenti cloruri, è opportuno utilizzare un campione con il più grande volume possibile. Con il metodo della combustione, concentrazioni elevate di sale nei campioni analizzati possono comportare un deposito di sale sul catalizzatore e un'eccessiva corrosione del tubo di combustione. Occorre prendere delle precauzioni come indicato nel manuale d'uso del fabbricante.

Con il metodo persolfato/UV può succedere che i campioni molto torbidi e quelli contenenti particolati non si ossidino completamente.

Esempio di un metodo idoneo

Il carbonio organico non volatile è determinato mediante ossidazione con persolfato/irradiazione UV e il CO₂ sviluppato è dosato mediante spettrometria a infrarossi non dispersiva.

Il reagente di ossidazione è modificato conformemente alle indicazioni riportate in (2) e come indicato nel manuale d'uso del fabbricante.

- a) 8,2 g di HgCl₂ e 9,6 g di Hg(NO₃)₂ · H₂O sono disciolti in qualche centinaia di millimetri di acqua di reazione a bassa concentrazione di carbonio;
- b) 20 g di K₂S₂O₈ sono disciolti nella soluzione di sale mercurico;
- c) 5 ml di HNO₃ (concentrato) sono aggiunti alla miscela;
- d) il reagente è diluito fino ad un volume finale di 1 000 ml.

L'interferenza dovuta al cloruro è eliminata utilizzando un volume di campione di 40 µl per 10 % di cloruro e un volume di campione di 200 µl per 1,9 % di cloruro. Con questo metodo si possono analizzare campioni ad elevato contenuto di cloruro e/o volumi di campioni più grandi nella misura in cui si impedisce la formazione di cloruro nel recipiente di ossidazione. Successivamente, se necessario, si può determinare il carbonio organico volatile nel tipo di campione considerato.

BIBLIOGRAFIA

- (1) ISO, Water quality — determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, January 16, 1986.
 - (2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16th edition, 1985.
- Riveste interesse anche (contiene una descrizione del sistema di autoanalisi):
- (3) Schreurs W. (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, 137-142.

*Appendice 2***Biodegradazione nell'acqua di mare**

METODO DEL DIBATTIMENTO IN PALLONE

SCHEDA DATI

1. **LABORATORIO:**2. **DATA DI INIZIO DELLA PROVA:**3. **SOSTANZA IN ESAME:**

Nome:

Concentrazione della soluzione madre: mg/l di sostanza

Concentrazione iniziale nel mezzo, t_0 : mg/l di sostanza

: DOC mg/l

4. **ACQUA DI MARE:**

Provenienza:

Data del prelievo:

Profondità del prelievo:

Aspetto al momento del prelievo (ad es. torbidità ecc.):

Salinità al momento del prelievo: %

Temperatura al momento del prelievo: °C

DOC "x" ore dopo il prelievo: mg/l

Pretrattamento prima della prova (filtrazione, sedimentazione, invecchiamento ecc.)

Conteggio delle colonie microbiche — campione di partenza: colonie/ml

— all'inizio della prova: colonie/ml

Altre caratteristiche:

5. DETERMINAZIONI DEL CARBONIO:

Analizzatore di carbonio:

	Matraccio n.		DOC dopo n giorni (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Prova: acqua di mare fortificata con sostanze nutritive contenente la sostanza in esame	1	a ₁					
		a ₂					
		media, C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		media, C _{b(t)}					
Prova in bianco: acqua di mare fortificata con sostanze nutritive non contenente la sostanza in esame	1	c ₁					
		c ₂					
		media, C _{c(t)}					
	2	d ₁					
		d ₂					
		media, C _{d(t)}					
	media, C _{bl(t)} = $\frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. VALUTAZIONE DEI DATI GREZZI:

Matraccio n.	Calcolo dei risultati	% di degradazione dopo n giorni				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
Media (*)	$D_1 = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) se esiste una grande differenza tra D₁ e D₂ non si deve fare la media tra questi due valori.

Nota: tabelle analoghe possono essere utilizzate quando la degradazione è seguita da un'analisi specifica, e per la sostanza di riferimento e i controlli di tossicità.

7. DEGRADAZIONE ABIOTICA (facoltativa)

	Tempo (in giorni)	
	0	t
Concentrazione di COD (mg/l) nel controllo sterile	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ degradazione abiotica} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

Appendice 3

Calcolo della domanda biochimica teorica di ossigeno

METODO DELLA BOTTIGLIA CHIUSA

La ThOD della sostanza $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ di peso molecolare PM è calcolata in base alla formula:

$$ThOD_{NH_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o \right]}{MW}$$

Questo calcolo presuppone che C venga mineralizzato in CO_2 , H in H_2O , P in P_2O_5 e Na in Na_2O . Gli alogeni sono eliminati sotto forma di alogenuri di idrogeno e l'azoto sotto forma di ammoniaca.

Esempio:

Il glucosio $C_6H_{12}O_6$, di PM = 180

$$ThOD = \frac{16 \left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6 \right)}{180} = 1,07 \text{ mg O}_2/\text{mg glucosio}$$

I pesi molecolari dei sali diversi da quelli dei metalli alcalini sono calcolati presupponendo che siano stati idrolizzati.

Si considera che lo zolfo sia ossidato allo stato +6.

Esempio:

Il dodecilbenzensolfonato di sodio $C_{18}H_{29}SO_3Na$, di PM = 348

$$ThOD = \frac{16 \left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ mg O}_2/\text{mg sostanza}$$

Nel caso di sostanze azotate, l'azoto può essere eliminato sotto forma di ammoniaca, di nitrito o di nitrato corrispondente a domande teoriche biochimiche di ossigeno.

$$ThOD_{NO_2} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o \right]}{MW}$$

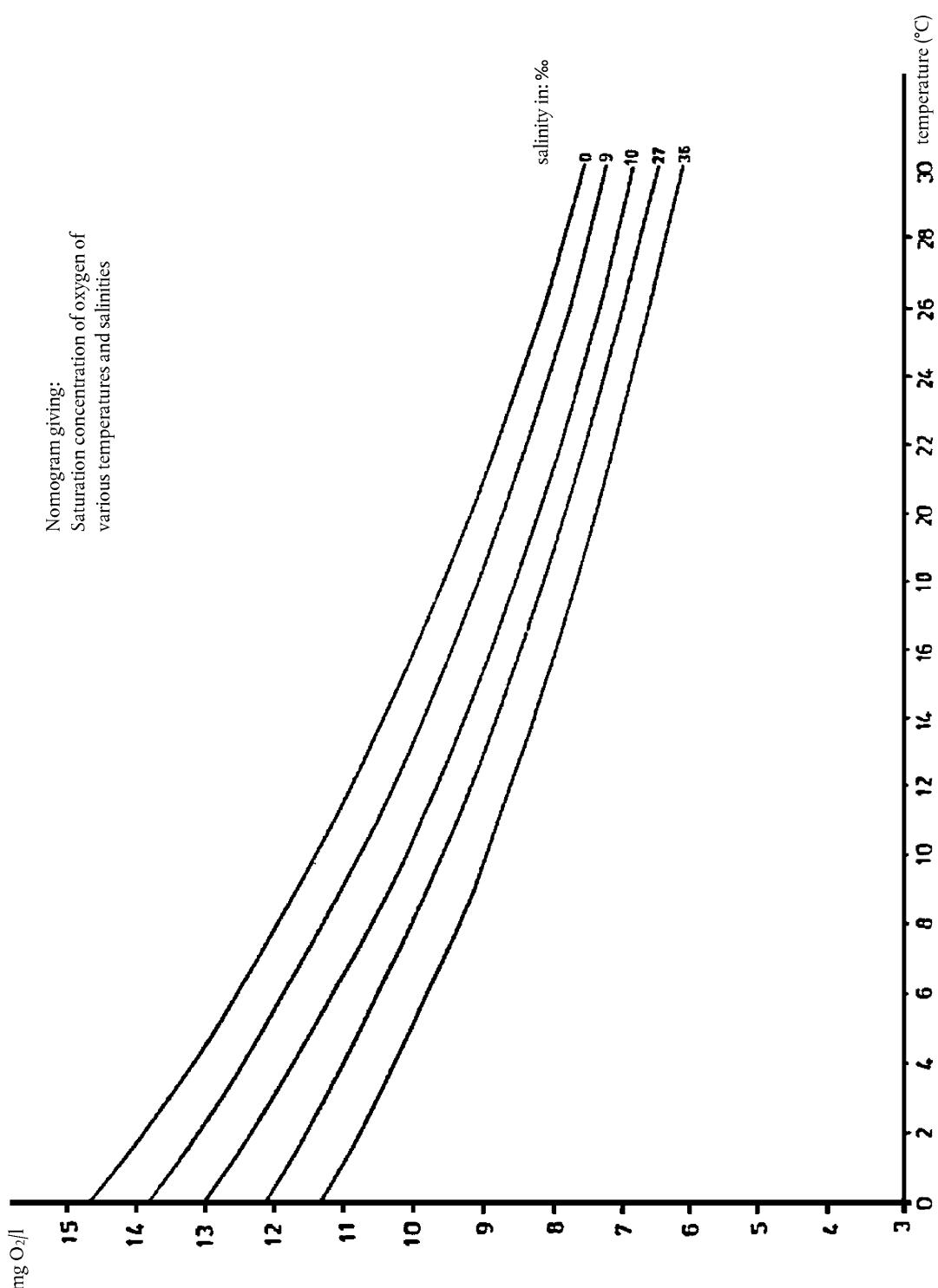
$$ThOD_{NO_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o \right]}{MW}$$

Ad esempio, se nel caso di un'ammina secondaria, l'analisi indica che l'azoto era interamente sotto forma di nitrato:

$(C_{12}H_{25})_2 NH$, di PM = 353

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16 \left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ mg O}_2/\text{mg sostanza}$$

Appendice 4



Appendice 5

Biodegradazione nell'acqua di mare

METODO DELLA BOTTIGLIA CHIUSA

SCHEDA DATI

- 1. LABORATORIO:**
- 2. DATA DI INIZIO DELLA PROVA:**
- 3. SOSTANZA IN ESAME:**

Nome:

Concentrazione della soluzione madre: mg/l

Conc. iniziale nel mezzo contenente acqua di mare: mg/l

ThOD o COD: mg O₂/mg della sostanza in esame

- 4. ACQUA DI MARE:**

Provenienza:

Data del prelievo:

Profondità del prelievo:

Aspetto al momento del prelievo (ad es. torbidità ecc.):

Salinità al momento del prelievo: %

Temperatura al momento del prelievo: °C

DOC "x" ore dopo il prelievo: mg/l

Pretrattamento prima della prova (ad es. filtrazione, sedimentazione, invecchiamento ecc.):

Conteggio delle colonie microbiche	— campione di partenza:	colonie/ml
	— all'inizio della prova:	colonie/ml

Altre caratteristiche:

- 5. MEZZO DI PROVA:**

Temperatura dopo aerazione: °C

Concentrazione di O₂ dopo aerazione e prima dell'inizio della prova: mg O₂/l

- 6. DETERMINAZIONE DELL'OSSIGENO DISCiolto:**

Metodo: Winkler/elettrodo

	Matraccio n.		mg O ₂ /l dopo n giorni			
			0	5	15	28
Prova: acqua di mare, fortificata con sostanze nutritive, contenente la sostanza in esame	1	a ₁				
	2	a ₂				
	Media della prova	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

	Matraccio n.		mg O ₂ /l dopo n giorni			
			0	5	15	28
Prova in bianco: acqua di mare fortificata con nutrienti, senza sostanza in esame	1	c ₁				
	2	c ₂				
	Media della prova in bianco	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Nota: Tabelle analoghe possono essere utilizzate per la sostanza di riferimento e i controlli di tossicità.

7. DIMINUZIONE DELL'OSSIGENO DISCiolto: % DI DEGRADAZIONE (%D):

	Diminuzione dell'ossigeno dissolto dopo n giorni		
	5	15	28
(m _b - m _t) ⁽¹⁾			
%D = $\frac{(m_b - m_t) \text{ } (1)}{\text{sostanza in esame (mg/l)} \times \text{ThOD}} \times 100$			

⁽¹⁾ ciò presuppone che m_{b(0)} = m_{t(0)}, dove
 m_{b(0)} = valore della prova in bianco il giorno 0,
 m_{t(0)} = valore della sostanza in esame il giorno 0.
 Se m_{b(0)} non è uguale a m_{t(0)}, utilizzare (m_{t(0)} - m_{t(x)}) - (m_{b(0)} - m_{b(x)}), dove
 m_{b(x)} = valore della prova in bianco il giorno x,
 m_{t(x)} = valore della sostanza in esame il giorno x.

C.43. BIODEGRADABILITÀ ANAEROBICA DELLE SOSTANZE ORGANICHE NEI FANGHI DIGERITI: MISURAZIONE DELLA PRODUZIONE DI GAS

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 311 (2006). Una serie di prove di screening prende in esame la biodegradabilità aerobica delle sostanze organiche (metodi di prova C.4, C.9, C.10 e C.11 (1) e OECD TG 302C (2)). I risultati dell'applicazione di queste prove sono stati utilizzati con successo per prevedere il destino delle sostanze in ambiente aerobico, in particolare nelle fasi aerobiche del trattamento delle acque reflue. Proporzioni diverse di sostanze non solubili in acqua e sostanze che si adsorbono sulle particelle solide delle acque reflue sono anch'esse sottoposte a trattamento aerobico, in quanto presenti nei liquami sedimentati. Tuttavia, la maggior parte di queste sostanze è associata ai fanghi di sedimentazione primaria, che sono separati dalle acque reflue non trattate in vasche di sedimentazione prima che la parte sedimentata, o surnatante, delle acque reflue subisca il trattamento aerobico. I fanghi, che contengono alcune delle sostanze solubili nel liquido interstiziale, sono riversati in digestori riscaldati in cui subiscono il trattamento anaerobico. Finora non vi sono prove in questa serie che valutino la biodegradabilità anaerobica nei digestori anaerobici. La presente prova mira a colmare questa lacuna. Essa non è necessariamente applicabile ad altri comparti ambientali anossici.
2. Per valutare la biodegradabilità anaerobica sono state utilizzate con successo tecniche respirometriche che misurano le quantità di gas prodotti in condizioni anaerobiche, principalmente metano (CH_4) e biossido di carbonio (CO_2). Birch *et al.* (3) hanno esaminato questi processi concludendo che i lavori di Shelton e Tiedje (4), effettuati sulla base di studi precedenti (5) (6) (7), fossero i più completi. Il metodo (4), che è stato ulteriormente sviluppato da altri esperti (8) ed è diventato lo standard americano (9) (10), non ha risolto i problemi legati alla differenza di solubilità tra CO_2 e CH_4 nel mezzo di prova e al calcolo della produzione teorica di gas di una sostanza in esame. Raccomandando di misurare anche il tenore di carbonio inorganico disciolto nel liquido surnatante, la relazione ECETOC (3) ha esteso il campo d'applicazione della tecnica. Il metodo ECETOC è stato oggetto di una valutazione comparativa internazionale (*o ring test*) ed è diventato la norma ISO 11734 (11).
3. Questo metodo di prova, basato sulla norma ISO 11734 (11), descrive un metodo di screening per valutare la potenziale biodegradabilità anaerobica delle sostanze organiche in condizioni specifiche (vale a dire in un digestore anaerobico, in un dato momento e con una determinata gamma di concentrazioni di microrganismi). Poiché si usano fanghi diluiti con una concentrazione relativamente elevata della sostanza in esame e di norma la durata della prova è più lunga del tempo di ritenzione nei digestori anaerobici, le condizioni della prova non corrispondono necessariamente alle condizioni presenti nei digestori anaerobici né sono applicabili alla valutazione della biodegradabilità anaerobica delle sostanze organiche in diverse condizioni ambientali. I fanghi sono esposti alla sostanza in esame per un massimo di 60 giorni. Si tratta di un periodo più lungo rispetto al tempo di ritenzione medio dei fanghi (25-30 giorni) nei digestori anaerobici, sebbene nei siti industriali il periodo di ritenzione possa essere molto più esteso. Le previsioni sui risultati di questa prova sono meno convincenti rispetto a quelle relative alla biodegradazione aerobica, poiché i dati rilevati sul comportamento delle sostanze in esame nelle prove aerobiche "pronte" e nelle prove di simulazione nonché in ambiente aerobico sono sufficienti per poter ritenere che vi sia un nesso, mentre i dati disponibili per gli ambienti anaerobici sono molto più frammentati. Si può presupporre che una biodegradazione completa si verifichi quando si raggiunge il 75-80 % della produzione di gas teorica. L'elevato rapporto tra sostanza e biomassa applicato nella presente prova implica che se una sostanza risulta biodegradabile in questa sede, sarà più facilmente degradabile in un digestore anaerobico. Inoltre, le sostanze che non si trasformano in gas nel corso della prova non necessariamente sono persistenti nelle condizioni in cui il rapporto tra sostanza e biomassa è più simile a quello esistente in natura. Si verificano inoltre altre reazioni anaerobiche capaci di degradare, almeno parzialmente, le sostanze, ad esempio la deolorazione, ma la presente prova non rileva tali reazioni. Tuttavia, alcuni metodi di analisi specifici per la determinazione della sostanza in esame permettono di monitorarne l'eliminazione (cfr. i paragrafi 6, 30, 44 e 53).

PRINCIPIO DELLA PROVA

4. I fanghi digeriti e lavati (1), che presentano concentrazioni basse (< 10 mg/l) di carbonio inorganico, sono diluiti almeno dieci volte in modo che la concentrazione dei solidi totali raggiunga da 1 g/l a 3 g/l e sono in

(1) I fanghi digeriti sono una miscela tra fasi sedimentate dei liquami e fanghi attivi, che sono stati incubati in un digestore anaerobico a circa 35 °C per ridurre la biomassa e gli odori e per migliorare la disidratabilità dei fanghi. Consiste nell'associazione di batteri fermentativi e metanogenici anaerobici che producono biossido di carbonio e metano (11).

seguito incubati a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ in recipienti sigillati con la sostanza in esame da 20 a 100 mg C/l per un periodo che si estende fino a 60 giorni. È possibile misurare l'attività dei fanghi conducendo parallelamente dei controlli in bianco con inoculo di fanghi nel mezzo, ma senza la sostanza in esame.

5. Si misura l'aumento della pressione nello spazio di testa nel recipiente, che risulta dalla produzione di biossido di carbonio e metano. Una parte significativa del CO₂ prodotto è disciolta nella fase liquida o trasformata in carbonato o in carbonato di idrogeno alle condizioni di prova. Tale carbonio inorganico è misurato alla fine della prova.
6. La quantità di carbonio (inorganico e metano) che risulta dalla biodegradazione della sostanza in esame è calcolata in base alla produzione netta di gas e alla formazione di carbonio inorganico nella fase liquida che eccede i valori dei controlli in bianco. L'entità della degradazione è calcolata a partire dalla produzione di carbonio inorganico totale e di carbonio da metano, espressa come percentuale della quantità misurata o calcolata del carbonio aggiunto come sostanza in esame. La biodegradazione può essere controllata con misurazioni intermedie della sola produzione di gas. Inoltre, la biodegradazione primaria può essere determinata attraverso analisi specifiche all'inizio e al termine della prova.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

7. È necessario disporre delle caratteristiche di purezza, solubilità in acqua, volatilità e adsorbimento della sostanza in esame al fine di permettere la corretta interpretazione dei risultati. Occorre conoscere il tenore (%) del peso) di carbonio organico della sostanza in esame, desumendolo dalla sua struttura chimica oppure misurandolo. Per le sostanze in esame volatili, è utile disporre della costante di Henry misurata o calcolata per sapere se la prova è applicabile. Le informazioni sulla tossicità della sostanza in esame per i batteri anaerobici sono utili nella scelta della concentrazione sperimentale adatta e per l'interpretazione dei risultati che indicano una scarsa biodegradabilità. Si raccomanda di includere un controllo per l'inibizione, tranne nel caso in cui si sappia che la sostanza in esame non inibisce l'attività anaerobica dei microbi (cfr. paragrafo 21 e ISO 13641-1 (12)).

APPLICABILITÀ DEL METODO DI PROVA

8. Il metodo di prova può essere applicato a sostanze idrosolubili; può essere inoltre applicato a sostanze scarsamente solubili e insolubili, purché si ricorra a una metodologia di dosaggio esatta (cfr., ad esempio, ISO 10634 (13)). In generale, nel caso di sostanze volatili occorre decidere caso per caso. Può essere necessario adottare particolari accorgimenti, ad esempio impedire la perdita di gas durante la prova.

SOSTANZE DI RIFERIMENTO

9. Per verificare la procedura, occorre svolgere un saggio parallelo su una sostanza di riferimento in recipienti adeguati nel quadro delle normali prove sperimentali. Il fenolo, il benzoato di sodio e il polietilenglicole 400 sono esempi di sostanze di riferimento e la degradazione attesa dovrebbe superare il 60 % della produzione di gas teorica (ossia metano e carbonio inorganico) nell'arco di 60 giorni (3) (14).

RIPRODUCIBILITÀ DEI RISULTATI DELLE PROVE

10. In una prova interlaboratorio internazionale (14) è stata rilevata una buona riproducibilità delle misurazioni della produzione di gas in recipienti in triplicato. La deviazione standard relativa (coefficiente di variazione) era quasi sempre inferiore al 20 %, pur superando spesso questo valore in presenza di sostanze tossiche o verso la fine del periodo di incubazione di 60 giorni. In recipienti dal volume inferiore a 150 ml sono state rilevate anche deviazioni maggiori. I valori finali del pH dei mezzi sperimentali si sono attestati nell'intervallo 6,5-7,0.

11. La prova interlaboratorio ha fornito i seguenti risultati.

Sostanza in esame	Dati totali n ₁	Degradazione media (dei dati totali) (%)	Deviazione standard relativa (dei dati totali) (%)	Dati validi n ₂	Degradazione media (dei dati validi) (%)	Deviazione standard relativa (dei dati validi) (%)	Dati >60 % Degradazione nelle prove valide n ₃
Acido palmitico	36	68,7 ± 30,7	45	27	72,2 ± 18,8	26	19 = 70 % (*)
Polietilene Glicole 400	38	79,8 ± 28,0	35	29	77,7 ± 17,8	23	24 = 83 % (*)

(*) Proporzione di n₂

12. I coefficienti di variazione della media di tutti i risultati ottenuti con l'acido palmitico e il polietilenglicole 400 si sono attestati rispettivamente al 45 % (n = 36) e al 35 % (n = 38). Escludendo i valori < 40 % e > 100 % (il primo valore è presumibilmente dovuto a condizioni subottimali, il secondo a cause sconosciute), i coefficienti di variazione sono diminuiti, rispettivamente, al 26 % e al 23 %. Le proporzioni di valori "validi" con una percentuale di degradazione di almeno il 60 % erano pari al 70 % per l'acido palmitico e all'83 % per il polietilenglicole 400. Le proporzioni della percentuale di biodegradazione calcolate a partire dalle misurazioni del carbonio inorganico disciolto erano relativamente limitate, ma variabili. Per l'acido palmitico la percentuale era compresa tra lo 0 e il 35 %, con una media del 12 % e un coefficiente di variazione del 92 %, mentre per il polietilenglicole 400 la percentuale era tra lo 0 % e il 40 %, con una media del 24 % e un coefficiente di variazione del 54 %.

DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

Apparecchiatura

13. Occorre utilizzare normali apparecchiature di laboratorio e quanto indicato di seguito:

- incubatore — anti-scintilla e termostatato a 35 °C ± 2 °C;
- recipienti di prova in vetro resistenti alla pressione di dimensioni nominali appropriate⁽¹⁾, ciascuna provvista di un setto a tenuta di gas, con resistenza di circa 2 bar. Il volume dello spazio di testa è compreso all'incirca tra il 10 % e il 30 % del volume totale. Se il biogas è rilasciato in maniera regolare, è appropriato uno spazio di testa di circa il 10 %, ma se il rilascio di gas avviene solamente al termine della prova la percentuale adeguata è del 30 %. In caso di rilascio di pressione ad ogni campionamento, si raccomanda di utilizzare bottiglie in vetro da siero, con un volume nominale di 125 ml e un volume totale di circa 160 ml, sigillate con setti adeguati alle bottiglie da siero⁽²⁾ e fissati con anelli di alluminio;
- manometro⁽³⁾ in grado di misurare e fare sfidare il gas prodotto, ad esempio un dispositivo manuale di precisione collegato a un ago da siringa appropriato; una valvola a tre vie a tenuta di gas permette di sfidare la pressione in eccesso (appendice 1). È necessario mantenere il volume interno delle tubature e della valvola del trasduttore di pressione al livello più basso possibile, in modo da contenere al massimo eventuali errori nell'ipotesi in cui si trascuri il volume delle apparecchiature;

⁽¹⁾ La dimensione raccomandata va da 0,1 a 1 litro.

⁽²⁾ Si raccomanda l'uso di setti in silicone a tenuta di gas. Si raccomanda inoltre di verificare che i tappi siano effettivamente a tenuta di gas, specialmente per quelli con setti in butile, in quanto molti dei setti disponibili in commercio non sono sufficientemente stagni per il metano e alcuni non lo sono più se vengono perforati con un ago come richiesto dal protocollo della prova.

⁽³⁾ Il manometro di precisione deve essere utilizzato e tarato a intervalli regolari, secondo le istruzioni del fabbricante. Se si utilizza un manometro della qualità prescritta (ad es. incapsulato con una membrana di acciaio), non è necessario tararlo in laboratorio. L'accuratezza della taratura può essere verificata in laboratorio, confrontando una misurazione unica a 1×10^5 Pa con quella di un manometro ad indicatore analogico. Una misurazione corretta in questo punto garantisce che anche la linearità non venga alterata. Se vengono utilizzati altri dispositivi di misurazione (senza taratura certificata dal costruttore), si raccomanda di procedere a una taratura di tutta la gamma di valori, a intervalli regolari.

Nota — I rilevamenti della pressione sono usati direttamente per calcolare la quantità di carbonio prodotto nello spazio di testa (paragrafi da 42 a 44). In alternativa, i rilevamenti della pressione possono essere convertiti in volumi (a 35 °C, pressione atmosferica) di gas prodotto usando un grafico di conversione. Questo grafico si basa su dati ottenuti iniettando volumi noti di azoto gassoso in una serie di recipienti di prova (ad esempio bottiglie da siero) a 35 +/– 2 °C e registrando i conseguenti rilevamenti della pressione stabilizzata (cfr. appendice 2). Il calcolo è illustrato nella nota del paragrafo 44.

Avvertenza — Fare attenzione a non pungersi con gli aghi delle micro-siringhe.

- d. analizzatori di carbonio, adatti per determinare in maniera diretta il carbonio inorganico tra 2 mg/l e 200mg/l;
- e. siringhe ad alta precisione per i campioni gassosi e liquidi;
- f. agitatori e ancorette magnetici (facoltativo);
- g. scatola a guanti (raccomandato).

Reagenti

14. Impiegare sempre reagenti puri per analisi.

Acqua

15. Acqua distillata o deionizzata (de-ossigenata per gorgogliamento con azoto gassoso che contiene meno di 5 µl/l di ossigeno) con un tenore inferiore a 2 mg/l di carbonio organico disiolto.

Mezzo di prova

16. Preparare il mezzo di diluizione affinché possa contenere i seguenti componenti nelle quantità indicate;

Diidrogenofosfato di potassio anidro (KH_2PO_4)	0,27 g
Idrogenofosfato di disodio dodecaidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	1,12 g
Cloruro di ammonio (NH_4Cl)	0,53 g
Cloruro di calcio diidrato ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,075g
Cloruro di magnesio esaидrato ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,10 g
Cloruro di ferro (II) tetraidrato ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,02 g
Resazurina (indicatore di ossigeno)	0,001g
Sodio solfuro nonaidrato ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	0,10 g
Soluzione madre di oligoelementi (facoltativo, paragrafo 18)	10 ml
Portare al volume di 1 litro con acqua de-ossigenata (paragrafo 15).	

Nota: Usare solfuro di sodio preparato al momento oppure lavarlo e asciugarlo prima dell'uso per garantire una capacità di riduzione sufficiente. Tale prova può essere eseguita senza usare una cappa con guanti (cfr. paragrafo 26). In questo caso la concentrazione finale di solfuro di sodio nel mezzo va aumentata a 0,20 g di $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ per litro. Il solfuro di sodio può essere aggiunto a partire da una soluzione madre anaerobica appropriata attraverso il setto dei recipienti di prova chiusi, in quanto tale procedura riduce il rischio di ossidazione. Il solfuro di sodio può essere sostituito da citrato di titanio (III), aggiunto tramite il setto di

recipienti di prova chiusi con una concentrazione finale che può variare da 0,8 a 1,0 mmol/l. Il citrato di titanio (III) è un agente riduttore molto efficace e poco tossico, che si può preparare come segue: dissolvere 2,94 g di citrato di trisodio diidrato in 50 ml di acqua de-ossigenata (per ottenere una soluzione di 200 mmol/l) e aggiungere 5 ml di una soluzione di cloruro di titanio (III) al 15 % (peso/volume). Neutralizzare a pH $7 \pm 0,2$ con una base minerale e versare in un recipiente appropriato sotto un getto di azoto. La concentrazione di citrato di titanio (III) in questa soluzione madre è di 164 mmol/l.

17. Mescolare gli ingredienti del mezzo di prova ad eccezione dell'agente riduttore (solfuro di sodio, citrato di titanio) gorgogliando azoto gassoso sulla soluzione per circa 20 minuti, immediatamente prima dell'uso, al fine di eliminare l'ossigeno. Aggiungere poi la quantità appropriata della soluzione di agente riduttore appena preparata (preparazione in acqua de-ossigenata) subito prima di usare il mezzo. Regolare il pH del mezzo, se necessario, con un acido o una base minerale diluiti a $7 \pm 0,2$.

Soluzione madre di oligoelementi (opzionale)

18. Al fine di migliorare i processi di degradazione anaerobica, soprattutto se la concentrazione dell'inoculo è bassa (ad esempio 1 g/l) (11), si raccomanda l'uso di un mezzo di prova contenente i seguenti oligoelementi.

Cloruro di manganese (II) tetraidrato ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	50 mg
Acido borico (H_3BO_3)	5 mg
Cloruro di zinco ($ZnCl_2$)	5 mg
Cloruro di rame (II) ($CuCl_2$)	3 mg
Molibdato di disodio diidrato ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	1 mg
Cloruro di cobalto esaidsrato ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	100 mg
Cloruro di nichel esaidsrato ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	10 mg
Selenito di sodio (Na_2SeO_3)	5 mg

Portare al volume di 1 litro con acqua de-ossigenata (paragrafo 15)

Sostanza in esame

19. Aggiungere la sostanza in esame sotto forma di soluzione, sospensione o emulsione madre, o direttamente allo stato solido o liquido, o adsorbita su un filtro in fibra di vetro, in modo da ottenere una concentrazione non superiore a 100 mg/l di carbonio organico. Se si utilizza una soluzione madre, preparare una soluzione appropriata con acqua previamente de-ossigenata con gorgogliamento all'azoto gassoso (paragrafo 15) a una concentrazione tale che il volume aggiunto sia inferiore al 5 % del volume totale della miscela di reazione. Il pH della soluzione madre deve essere regolato a $7 \pm 0,2$, se necessario. Per le sostanze non sufficientemente solubili in acqua, consultare la norma ISO 10634 (13). Se si utilizza un solvente, preparare un controllo supplementare in cui al mezzo inoculato viene aggiunto solo il solvente. I solventi organici che prevengono la produzione di metano, come il cloroformio e il tetrachloruro di carbonio, sono da evitare.

Avvertenza — Manipolare con attenzione le sostanze in esame tossiche e dalle proprietà sconosciute.

Sostanze di riferimento

20. Le sostanze di riferimento, come il benzoato di sodio, il fenolo e il polietilenglicole 400 sono già state usate con successo per verificare la procedura, in quanto vengono biodegradate a più del 60 % nell'arco di 60 giorni. Preparare una soluzione madre (in acqua de-ossigenata) della sostanza di riferimento scelta, con le stesse modalità della sostanza in esame, e regolare il pH a $7 \pm 0,2$, se necessario.

Controllo per l'inibizione (facoltativo)

21. Per ottenere le informazioni sulla tossicità della sostanza in esame per i microrganismi anaerobici che consentano di individuare la concentrazione di prova più appropriata, è necessario aggiungere la sostanza in esame e la sostanza di riferimento in un recipiente contenente il mezzo di prova (cfr. paragrafo 16), ciascuna alle stesse concentrazioni aggiunte al mezzo di prova durante la prova (cfr. i paragrafi 19 e 20 e la norma ISO 13641-1 (12)).

Fanghi digeriti

22. Prelevare i fanghi digeriti da un digestore in un impianto di trattamento di acque reflue che tratta prevalentemente liquami domestici. I fanghi devono essere caratterizzati in modo esaustivo e le informazioni di riferimento devono essere inserite nella relazione (cfr. il paragrafo 54). Se si intende fare uso di un inoculo adattato, occorre eventualmente prevedere di prelevare i fanghi digeriti da un impianto di trattamento delle acque reflue industriali. Per raccogliere i fanghi digeriti utilizzare bottiglie a collo ampio in polietilene ad alta densità o materiali analoghi, espandibili. Aggiungere i fanghi fino a coprire circa 1 cm del fondo delle bottiglie e chiudere ermeticamente, preferibilmente con una valvola di sicurezza. Una volta giunti in laboratorio, i fanghi raccolti possono essere usati direttamente o inseriti in un digestore da laboratorio. Eliminare l'eccesso di biogas aprendo con cautela le bottiglie che contengono i fanghi. In alternativa, è possibile usare fanghi anaerobici coltivati in laboratorio come fonte di inoculo, ma il loro spettro di attività potrebbe essere alterato.

Avvertenza: i fanghi digeriti producono gas infiammabili che comportano rischi di incendio e di esplosione e contengono organismi potenzialmente patogeni. Si raccomanda quindi di adottare precauzioni adeguate al momento di manipolarli. Per motivi di sicurezza, non utilizzare recipienti di vetro per la raccolta dei fanghi.

23. Per ridurre la produzione di gas di fondo e ridurre l'impatto dei controlli in bianco, si può considerare una predigestione dei fanghi. Se è necessaria una predigestione, i fanghi devono essere messi in condizione di essere digeriti senza l'aggiunta di nutrienti o substrati, a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per un periodo fino a 7 giorni. Per un numero ridotto di sostanze in esame, è stato osservato che una predigestione di circa 5 giorni comporta abitualmente una riduzione ottimale della produzione di gas nel bianco, senza che vi sia né un aumento inaccettabile della fase di latenza e dei periodi di incubazione durante la fase di prova, né una perdita di attività.
24. Per le sostanze in esame che sono o rischiano di essere poco biodegradabili, si prenderà in considerazione una pre-esposizione dei fanghi alla sostanza in esame, al fine di ottenere un inoculo più adatto. In questo caso si aggiunge ai fanghi digeriti la sostanza in esame a una concentrazione di carbonio organico che può variare da 5 mg/l a 20 mg/l e si procede a un'incubazione per un massimo di due settimane. Lavare accuratamente i fanghi prima dell'uso (cfr. paragrafo 25) e indicare le condizioni della pre-esposizione nella relazione sulla prova.

Inoculo

25. Lavare i fanghi immediatamente prima dell'uso (paragrafi da 22 a 24) al fine di ridurre la concentrazione di carbonio inorganico a meno di 10 mg/l nella sospensione di prova finale. Centrifugare i fanghi in un tubo sigillato (ad esempio per 5 minuti a 3 000 g) e scartare il surnatante. Sospendere il pellet che risulta da questa procedura in un mezzo de-ossigenato (paragrafi 16 e 17), centrifugare nuovamente la sospensione e scartare il liquido surnatante. Se il tenore di carbonio inorganico non è stato sufficientemente ridotto, il lavaggio dei fanghi può essere ripetuto al massimo due volte. Tale trattamento non sembra nuocere ai microrganismi. Infine, sospendere il pellet nel volume richiesto di mezzo di prova e determinare la concentrazione di solidi totali [cfr. ad esempio ISO 11923 (15)]. La concentrazione finale di solidi totali nei recipienti di prova deve essere compresa tra 1 g/l e 3 g/l (o all'incirca il 10 % della concentrazione presente nei fanghi digeriti non diluiti). Condurre le operazioni di cui sopra in modo tale da limitare al minimo indispensabile il contatto tra i fanghi e l'ossigeno (ad es. in atmosfera azotata).

PROCEDURA DI PROVA

26. Eseguire le procedure iniziali adottando tecniche volte a limitare al minimo necessario il contatto tra fanghi digeriti e ossigeno. Ad esempio, potrebbe essere necessario lavorare in una cappa con guanti in atmosfera azotata e/o spurgare le bottiglie con azoto (4).

Preparazione della prova e prove di controllo

27. Preparare i recipienti in almeno tre esemplari (cfr. il paragrafo 13-b) per la sostanza in esame, i controlli in bianco, la sostanza di riferimento, i controlli per l'inibizione (facoltativi) e per le camere di controllo della pressione (procedura facoltativa) (cfr. paragrafi 7 e 19-21). Si possono anche preparare recipienti supplementari per valutare la biodegradazione primaria con analisi specifiche per la sostanza in esame. La stessa serie di controlli in bianco può essere utilizzata per una serie di sostanze in esame, a condizione che i volumi dello spazio di testa siano omogenei.

28. Preparare l'inoculo diluito prima di aggiungerlo ai recipienti, ad esempio per mezzo di una pipetta ad imboccatura larga. Aggiungere aliquote di inoculo ben mescolato (paragrafo 25) per far sì che la concentrazione dei solidi totali sia uguale in tutti i recipienti (tra 1 g/l e 3 g/l). Aggiungere le soluzioni madre delle sostanze in esame e di riferimento, dopo aver regolato il pH a $7 \pm 0,2$, se necessario. È opportuno aggiungere la sostanza in esame e la sostanza di riferimento ricorrendo alla via più appropriata (cfr. paragrafo 19).
29. La concentrazione di prova del carbonio organico di norma varia da 20 a 100 mg/l (paragrafo 4). Se la sostanza in esame è tossica, la concentrazione di prova va ridotta a 20 mg C/l, o addirittura a un valore inferiore se va misurata solo la biodegradazione primaria con analisi specifiche. Si noti che la variabilità dei risultati della prova aumenta con concentrazioni sperimentali più basse.
30. Nei recipienti per i controlli in bianco, aggiungere un quantitativo equivalente del vettore utilizzato per aggiungere la sostanza in esame, invece della soluzione, sospensione o emulsione madre. Se la sostanza in esame è stata introdotta su un filtro di fibra di vetro o con solventi organici, aggiungere ai bianchi un filtro o un solvente dal volume equivalente a quello evaporato. Includere un recipiente di prova aggiuntivo contenente la sostanza in esame per misurare il pH. Regolare il pH a $7 \pm 0,2$, se necessario, con piccole quantità di basi o acidi inorganici diluiti. Aggiungere la stessa quantità di agenti di neutralizzazione a tutti i recipienti di prova. Non dovrebbe essere necessario procedere a tali aggiunte poiché il pH della soluzione madre della sostanza in esame e della sostanza di riferimento è già stato regolato (cfr. paragrafi 19 e 20). Se è necessario misurare la biodegradazione primaria, si preleva un campione adeguato dal recipiente destinato all'analisi del livello di pH o da un recipiente di prova supplementare e si procede alla misurazione della concentrazione della sostanza in esame con analisi specifiche. Se la miscela di reazione richiede un'agitazione, dei magneti ricoperti possono essere aggiunti a tutti i recipienti (facoltativo).
31. Garantire che il volume totale del liquido V_1 e dello spazio di testa V_h siano uguali in tutti i recipienti. Annotare e registrare i valori di V_1 e V_h . Ogni recipiente va sigillato mediante un setto a tenuta di gas e trasferito dalla scatola a guanti (cfr. paragrafo 26) all'incubatore (cfr. paragrafo 13-a))

Sostanze in esame insolubili

32. I quantitativi pesati di sostanze scarsamente idrosolubili vengono versati direttamente nei recipienti preparati. Se è necessario usare un solvente (cfr. paragrafo 19), trasferire la soluzione o sospensione della sostanza in esame nei recipienti vuoti. Se possibile, fare evaporare il solvente facendo passare dell'azoto gassoso nei recipienti e in seguito aggiungere gli altri ingredienti, ossia i fanghi diluiti (paragrafo 25) e l'acqua de-ossigenata, come richiesto. Va preparato anche un ulteriore solvente di controllo (paragrafo 19). Per altri metodi di aggiunta di sostanze insolubili si può consultare la norma ISO 10634 (13). Le sostanze liquide in esame possono essere introdotte con una siringa nei recipienti completamente preparati e sigillati se si prevede che il pH iniziale non sia superiore a 7 ± 1 ; altrimenti aggiungere la sostanza in esame come indicato in precedenza (paragrafo 19).

Incubazione e misurazioni della pressione del gas

33. Incubare i recipienti preparati a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ per circa 1 ora per raggiungere l'equilibrio e rilasciare il gas in eccesso nell'atmosfera, ad esempio scuotendo a turno i singoli recipienti, inserendo l'ago nel manometro (paragrafo 13-c) tramite il setto e aprendo la valvola fino a quando il manometro non segnerà zero. Se in tale fase, o quando si effettuano misurazioni intermedie, la pressione dello spazio di testa è inferiore alla pressione atmosferica, bisogna aggiungere azoto gassoso per ripristinare la pressione atmosferica. Chiudere la valvola (cfr. paragrafo 13-c) e continuare l'incubazione al buio, accertandosi che tutte le parti dei recipienti siano mantenute alla temperatura di digestione. Esaminare i recipienti dopo 24-48 ore di incubazione. Escludere i recipienti in cui il liquido surnutante presenta una netta colorazione rosa, ossia quelli in cui la resazurina (cfr. paragrafo 16) ha cambiato colore rivelando la presenza di ossigeno (cfr. paragrafo 50). Sebbene il sistema possa tollerare piccole quantità di ossigeno, concentrazioni più importanti rischiano di inibire fortemente la biodegradazione anaerobica. L'eventuale invalidamento di singoli recipienti di una serie di tre recipienti identici è accettabile, ma esclusioni più frequenti devono indurre a verificare le modalità operative sperimentali e ripetere la prova.

34. Miscelare accuratamente il contenuto di ciascun recipiente agitando o mescolando per alcuni minuti, almeno 2 o 3 volte alla settimana e poco prima di ciascuna misurazione della pressione. L'agitazione risospnde l'incubo e permette di equilibrare i gas. Tutte le misurazioni della pressione devono avvenire rapidamente, poiché i recipienti di prova possono subire un calo di temperatura cui conseguirebbe un rilevamento errato dei valori. Mantenere alla temperatura di digestione l'intero recipiente di prova, incluso lo spazio di testa, quando si procede a misurare la pressione. Misurare la pressione gassosa, ad esempio inserendo l'ago per siringhe collegato al manometro attraverso il setto (paragrafo 13-c). Evitare con cura che entri acqua nell'ago della siringa. Se dovesse comunque succedere, asciugare le parti bagnate e sostituire l'ago. La tensione è misurata in millibar (cfr. paragrafo 42). La pressione gassosa dei recipienti può essere misurata a intervalli regolari, ad esempio settimanalmente, ed eventualmente l'eccesso di gas può essere rilasciato nell'atmosfera. In alternativa, si può misurare la pressione solo alla fine della prova, al fine di determinare la quantità di biogas prodotta.
35. Si raccomanda di procedere a rilevamenti intermedi della pressione gassosa, perché l'aumento della pressione indica entro quale data può essere terminata la prova e permette di seguire la cinetica (cfr. paragrafo 6).
36. Di norma, la prova termina dopo un periodo d'incubazione di 60 giorni, a meno che la curva di biodegradazione ottenuta a partire dalle misurazioni della pressione non abbia raggiunto la fase di plateau prima di tale periodo; si tratta della fase in cui è stata raggiunta la degradazione massima e la curva di biodegradazione presenta un andamento orizzontale. Se il valore di plateau è inferiore al 60 %, l'interpretazione è problematica perché ciò indica che solo una parte della molecola è stata mineralizzata oppure la presenza di un errore. Se, al termine del periodo di incubazione normale, si verifica una produzione di gas, ma è evidente che la fase di plateau non sia stata raggiunta, è necessario considerare di prolungare la prova per verificare se il plateau (> 60 %) sarà raggiunto successivamente.

Misurazione del carbonio inorganico

37. Alla fine della prova, dopo l'ultima misurazione della pressione gassosa, lasciare riposare i fanghi. Aprire i recipienti uno a uno e prelevare immediatamente un campione per determinare la concentrazione (mg/l) di carbonio inorganico nel liquido surnatante. Il liquido surnatante non può essere né centrifugato né filtrato, poiché tali trattamenti comporterebbero una perdita inaccettabile di biossido di carbonio disiolto. Se il surnatante non può essere analizzato subito dopo il campionamento, conservarlo in un recipiente sigillato, senza spazio di testa e raffreddato a 4 °C per un massimo di due giorni. Dopo aver misurato il carbonio inorganico, misurare e registrare il valore del pH.
38. In alternativa il carbonio inorganico nel surnatante può essere determinato indirettamente, rilasciando del carbonio inorganico disiolto sotto forma di biossido che può essere misurato nello spazio di testa. Dopo l'ultima misurazione della pressione gassosa, adeguare la pressione in ciascun recipiente di prova alla pressione atmosferica. Acidificare il contenuto di ciascun recipiente all'incirca a pH 1 aggiungendo acido concentrato (ad es. H₂SO₄) per mezzo del setto dei recipienti sigillati. Incubare i recipienti precedentemente agitati a 35 °C ± 2 °C per circa 24 ore e misurare con il manometro la pressione gassosa che risulta dal biossido di carbonio sviluppato.
39. Effettuare rilevamenti simili per il rispettivo bianco, per la rispettiva sostanza di riferimento e, se del caso, per i recipienti per il controllo dell'inibizione (cfr. paragrafo 21).
40. In determinati casi, in particolare qualora gli stessi recipienti di controllo siano utilizzati per più sostanze in esame, vanno prese in considerazione, se necessario, le concentrazioni intermedie di carbonio inorganico nei recipienti di prova e di controllo. In tal caso è necessario prevedere un numero sufficiente di recipienti per tutte le misurazioni intermedie. È preferibile procedere in questo modo piuttosto che prelevare i campioni da un unico recipiente. Quest'ultima opzione può essere utilizzata solo se il volume necessario per l'analisi del carbonio inorganico disiolto non sembra eccessivo. Il carbone inorganico disiolto va misurato dopo la misurazione della pressione gassosa, ma senza che il gas in eccedenza sia stato rilasciato, come descritto di seguito:
- prelevare campioni di surnatante del minor volume possibile, introducendo una siringa attraverso il setto, senza aprire i recipienti e determinare il tenore di carbonio inorganico del campione;
 - dopo aver prelevato il campione, il gas in eccesso può essere eventualmente rilasciato;

- occorre tenere conto del fatto che una diminuzione, anche minima, del volume del surnatante (ad esempio dell'1 %) può comportare un aumento sensibile del volume gassoso nello spazio di testa (V_h);
- le equazioni (cfr. paragrafo 44) vengono corrette, se necessario, aumentando V_h nell'equazione 3.

Analisi specifiche

41. Se si deve determinare la degradazione anaerobica primaria (cfr. paragrafo 30), all'inizio e alla fine della prova si preleva dai recipienti contenenti la sostanza in esame un campione di volume sufficiente per le analisi specifiche. Se si procede in tal senso, va tenuto presente che i volumi dello spazio di testa (V_h) e del liquido (V_l) subiranno delle alterazioni di cui è necessario tenere conto nel calcolo dei risultati della produzione di gas. In alternativa, possono essere prelevati anche campioni per ulteriori analisi da miscele supplementari previste a tal fine (paragrafo 30).

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

42. Per questioni pratiche, la pressione gassosa è misurata in millibar (1 mbar = 1h Pa = 10^2 Pa; 1 Pa = 1 N/m²), il volume in litri e la temperatura in gradi Celsius.

Carbonio nello spazio di testa

43. Considerato che 1 mol di metano e 1 mol di biossido di carbonio contengono ciascuna 12 g di carbonio, la massa di carbonio in un dato volume di gas sviluppato può essere espressa come segue:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Equazione [1]}$$

dove:

m = massa di carbonio (mg) in un determinato volume di gas sviluppato;

12 = massa atomica relativa del carbonio;

n = numero di moli di gas nel volume specifico.

Se un gas diverso dal metano o dal biossido di carbonio (ad esempio N₂O) è generato in quantità considerevole, è opportuno modificare la formula [1] in modo da descrivere i possibili effetti dei gas generati.

44. Secondo le leggi del gas, n può essere espresso come segue:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Equazione [2]}$$

dove:

p = pressione gassosa (Pascal);

V = volume del gas (m³);

R = costante molare del gas [8,3141J/(mol K)]

T = temperatura di incubazione (Kelvins).

Combinando le equazioni [1] e [2] e adattando la formula per tenere conto della produzione di gas nel bianco, si ottiene l'equazione:

$$m_h = \frac{12\ 000 \times 0,1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Equazione [3]}$$

dove:

m_h = massa di carbonio netto prodotta sotto forma di gas nello spazio libero (mg);

Δp = media della differenza tra pressioni iniziali e finali nei recipienti di prova meno la media corrispondente nei recipienti in bianco (millibar);

V_h = volume dello spazio di testa nel recipiente (l);

0,1 = conversione sia per newtons/m² in millibar sia per m³ in litri.

L'equazione [4] va usata per la temperatura di incubazione normale di 35 °C (308 K):

$$m_h = 0,468(\Delta p \cdot V_h) \quad \text{Equazione [4]}$$

Avvertenza: Calcolo alternativo del volume. Le misurazioni tramite manometro sono convertite in ml di gas prodotto applicando la curva standard che illustra il rapporto tra il volume iniettato (ml) e i valori rilevati sul manometro (Appendice 2). Il numero di moli (n) di gas nello spazio di testa di ciascun recipiente è calcolato dividendo la produzione di gas cumulativa (ml) per 25 286 ml/mol, ossia il volume occupato da una mole di gas a 35 °C con pressione atmosferica standard. Poiché 1 mol di CH₄ e 1 mol di CO₂ contengono ciascuna 12 g di carbonio, la quantità di carbonio (m, mg) nello spazio di testa (m_h) è data dall'equazione [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Equazione [5]}$$

Adeguamento per tenere conto della produzione di gas del controllo in bianco:

$$m_h = \frac{12\ 000 \times \Delta V}{25\ 286} = 0,475\Delta V \quad \text{Equazione [6]}$$

dove:

- m_h = massa di carbonio netto prodotta sotto forma di gas nello spazio libero (mg);
- ΔV = media della differenza tra il volume gassoso prodotto nello spazio di testa nel recipiente di prova e nei recipienti di controllo in bianco;
- 25 286 = volume occupato da 1 mol di gas a 35 °C e a 1 atmosfera.

45. È possibile seguire lo svolgimento della biodegradazione in un grafico che mette in rapporto l'aumento di pressione cumulato D_p (millibar) e il fattore tempo, se del caso. In base a questa curva, individuare e registrare la fase di latenza (giorni). La fase di latenza è il tempo che intercorre tra l'inizio della prova e il momento in cui il deterioramento inizia a essere significativo (l'appendice 3 ne illustra un esempio). Se sono stati prelevati e analizzati campioni intermedi del surnatante (paragrafi 40, 46 e 47), il carbonio totale prodotto (nel gas e nel liquido) può essere riportato sul grafico al posto della sola pressione cumulativa.

Carbonio nel liquido

46. Si trascura la quantità di metano nel liquido, in quanto la sua solubilità in acqua è notoriamente molto bassa. Calcolare la massa di carbonio inorganico nel liquido dei recipienti di prova in base all'equazione [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad \text{Equazione [7]}$$

dove:

- m_l = massa di carbonio inorganico nel liquido (mg);
- C_{net} = concentrazione di carbonio inorganico nei recipienti di prova a cui viene sottratto quello contenuto nei recipienti di prova alla fine della prova;
- V_l = volume del liquido nel recipiente (l).

Carbonio gassificato totale

47. Calcolare la massa di carbonio gassificato nel liquido del recipiente di prova in base all'equazione [8]:

$$m_t = m_h + m_l \quad \text{Equazione [8]}$$

dove:

- m_t = massa totale di carbonio gassificato (mg);
- m_h e m_l vedi sopra.

Carbonio della sostanza in esame

48. Calcolare la massa di carbonio nei recipienti di prova derivata dalla sostanza in esame aggiunta, in base all'equazione [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \quad \text{Equazione [9]}$$

dove:

m_v = massa di carbonio della sostanza in esame (mg);

C_c = concentrazione della sostanza in esame nel recipiente di prova (mg/l);

V_l = volume del liquido nel recipiente di prova (l)

Livello di biodegradazione

49. Calcolare la percentuale di biodegradazione in base al gas nello spazio di testa usando l'equazione [10] e la percentuale totale di biodegradazione usando l'equazione [11]:

$$D_h = (m_h/m_v) \times 100 \quad \text{Equazione [10]}$$

$$D_t = (m_t/m_v) \times 100 \quad \text{Equazione [11]}$$

dove:

D_h biodegradazione in base al gas nello spazio di testa (%);

D_t biodegradazione totale, Dt (%);

m_h , m_v e m_t vedi sopra.

Il grado di biodegradazione primaria è calcolato in base alle misurazioni (facoltative) della concentrazione della sostanza in esame all'inizio e al termine dell'incubazione, utilizzando l'equazione [12]:

$$D_p = (1 - S_e/S_i) \times 100 \quad \text{Equazione [12]}$$

dove:

D_p = degradazione primaria della sostanza in esame (%);

S_i = concentrazione iniziale della sostanza in esame (mg/l);

S_e = concentrazione finale della sostanza in esame (mg/l).

Se il metodo di analisi indica concentrazioni significative della sostanza in esame nell'inoculo dei fanghi anaerobici non trattati, utilizzare l'equazione [13]:

$$D_p^1 = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{Equazione [13]}$$

dove:

D_p^1 = degradazione primaria corretta della sostanza in esame (%);

S_{ib} = concentrazione iniziale "apparente" della sostanza in esame nei controlli in bianco (mg/l);

S_{eb} = concentrazione finale "apparente" della sostanza in esame nei controlli in bianco (mg/l);

Validità dei risultati

50. Vanno usati solo i valori relativi alla pressione misurati nei recipienti che non presentano alcuna colorazione rosa (cfr. paragrafo 33). La contaminazione da ossigeno è ridotta al minimo mediante tecniche adeguate per la manipolazione in condizioni anaerobiche.
51. La prova è ritenuta valida se la sostanza di riferimento ha raggiunto un plateau che rappresenta più del 60 % di biodegradazione (¹).
52. Se, alla fine della prova, il valore del pH si attesta al di fuori dell'intervallo 7 ± 1 ed emerge una biodegradazione insufficiente, ripetere la prova aumentando la capacità tampone del mezzo.

(¹) Ciò va rivalutato se si includono sostanze chimiche di riferimento adsorbibili e insolubili.

Inibizione della degradazione

53. La produzione di gas nei recipienti contenenti la sostanza in esame e la sostanza di riferimento deve essere almeno pari a quella registrata nei recipienti che contengono la sola sostanza di riferimento. Altrimenti è indicato procedere all'inibizione della produzione di gas. In alcuni casi, la produzione di gas nei recipienti contenenti la sostanza in esame ma non la sostanza di riferimento è inferiore a quella dei controlli in bianco: ciò indica che la sostanza in esame è inibente.

Relazione sulla prova

54. La relazione sulla prova deve comprendere le seguenti informazioni:

Sostanza in esame:

- nome comune, nome chimico, numero CAS, formula strutturale e proprietà fisico-chimiche pertinenti;
- purezza (impurità) della sostanza in esame.

Condizioni della prova:

- volume del liquido diluito del digestore e volume dello spazio di testa (V_h) nel recipiente;
- descrizione dei recipienti di prova, delle principali caratteristiche della misurazione del biogas (ad esempio tipo di manometro) e dell'analizzatore di carbonio inorganico;
- applicazione della sostanza in esame e della sostanza di riferimento nel sistema sperimentale; concentrazione di prova usata e solvente, se del caso;
- dettagli sull'inoculo utilizzato: nome dell'impianto di trattamento delle acque reflue, descrizione della fonte delle acque reflue trattate (ad esempio temperatura, tempo di ritenzione dei fanghi, origine prevalentemente domestica, ecc.), concentrazione, tutte le informazioni che consentono di suffragare quanto precede e informazioni sull'eventuale pretrattamento dell'inoculo (per esempio predigestione, eventuale pre-esposizione);
- temperatura di incubazione;
- numero di repliche.

Risultati:

- valori del pH e del carbonio inorganico al termine della prova;
- concentrazione della sostanza in esame all'inizio e al termine della prova, se è stata adottata una misurazione specifica;
- tutti i valori rilevati nei recipienti di prova, nei bianchi, nei recipienti di controllo contenenti la sostanza di riferimento e nei recipienti per il controllo dell'inibizione, ove opportuno (ad esempio la pressione in millibar, la concentrazione del carbonio inorganico (mg/l)) sono presentati sotto forma di tabella (i valori misurati nello spazio di testa e il liquido devono essere riportati separatamente);
- elaborazione statistica dei dati, durata della prova e curva della biodegradazione della sostanza in esame, della sostanza di riferimento e del controllo per la tossicità;
- percentuale di biodegradazione della sostanza in esame e della sostanza di riferimento;
- giustificazione dell'eventuale invalidamento dei risultati della prova;
- discussione dei risultati.

BIBLIOGRAFIA

- (1) I seguenti capitoli del presente allegato:

C.4 Determinazione della pronta biodegradabilità;

C.9 Biodegradazione — Zahn-Wellens test

C.10 Prova di simulazione sui sistemi di trattamento aerobico dei liquami:

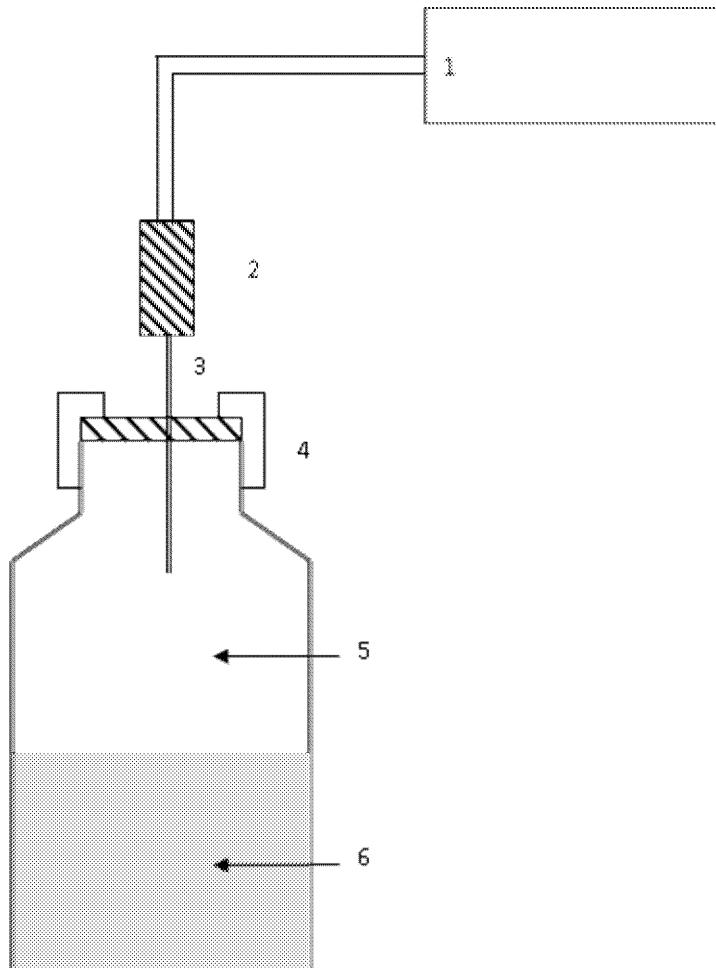
A) unità con fanghi attivi, B: biofilm.

C. 11 Biodegradazione — Fanghi attivi: saggio di inibizione della respirazione.

- (2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Paris

- (3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga,U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, (1989) W.J. Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550. (Also published as ECETOC Technical Report No. 28, June 1988).
- (4) Shelton D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Environ. Mircobiology, 47, 850-857.
- (5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. and McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Res. 13, 485-492.
- (6) Healy, J.B.Jr. and Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. Appl. Environ. Microbiol. 38, 84-89.
- (7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials, Philadelphia.
- (8) Battersby, N.S. and Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. Chemosphere, 17, 2441-2460.
- (9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.
- (10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.
- (11) International Organization for Standardization (1995) ISO 11 734 Water Quality — Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge — Method by measurement of the biogas production.
- (12) International Organization for Standardization (2003) ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1 General Test.
- (13) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
- (14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, 1499-1509.
- (15) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

Appendice 1

Esempio di apparecchio per la misurazione della produzione di biogas tramite la pressione gassosa*Legenda:*

- 1 — Manometro
- 2 — Valvola a tre vie a tenuta di gas
- 3 — Ago per siringa
- 4 — Sigillo a tenuta di gas (tappo a vite e setto)
- 5 — Spazio di testa (V_h)
- 6 — Inoculo di fanghi digeriti (V_i)

Recipienti di prova in un ambiente a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

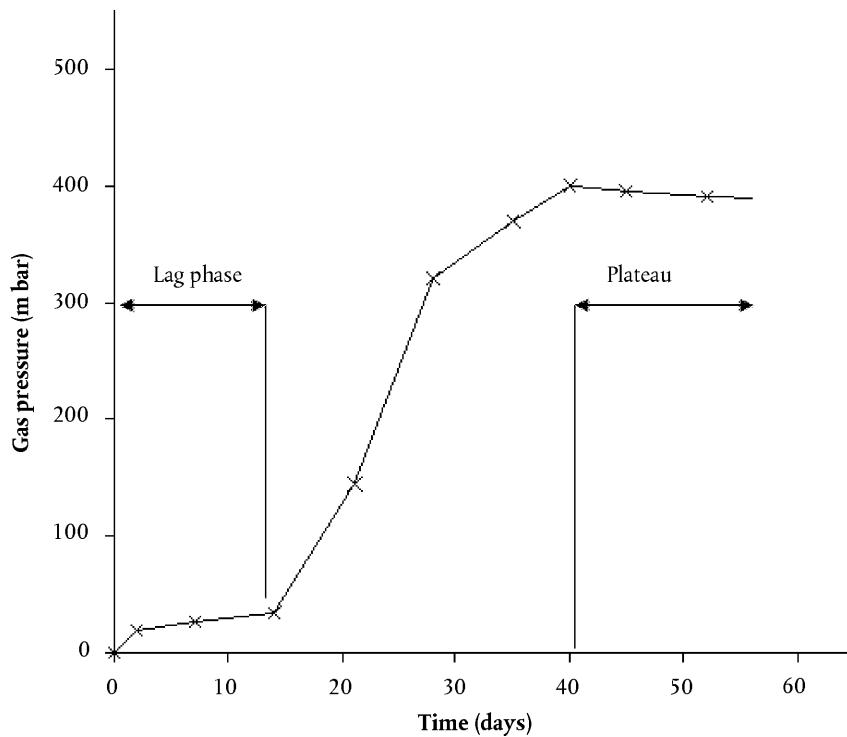
Appendice 2

Conversione dei rilevamenti manometrici

I rilevamenti del manometro possono essere correlati ai volumi gassosi tramite la curva standard prodotta iniettando specifici volumi di aria a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ in bottiglie da siero contenenti un volume di acqua pari a quello della miscela di reazione, V_R :

- versare aliquote di V_R ml di acqua, mantenuta a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ in cinque bottiglie da siero. Sigillare le bottiglie e posarle per un'ora a bagnomaria a 35°C per equilibrarle;
- accendere il manometro, attendere finché si è stabilizzato, e regolare su zero;
- inserire l'ago della siringa attraverso il setto di una delle bottiglie, aprire la valvola finché il manometro non segna zero e chiudere la valvola;
- ripetere questa procedura con le bottiglie restanti;
- iniettare 1 ml di aria a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ in ciascuna bottiglia. Inserire l'ago (del manometro) attraverso il sigillo di una delle bottiglie e lasciar stabilizzare la lettura della pressione. Registrare la pressione, aprire la valvola finché la pressione segnata non è pari a zero e poi richiuderla;
- ripetere la procedura con le restanti bottiglie;
- ripetere l'intera procedura utilizzando 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml e 50 ml di aria;
- tracciare una curva di conversione della pressione (Pa) in funzione del volume di gas iniettato (ml). La risposta dello strumento è lineare nell'intervallo da 0 Pa a 70 000 Pa e da 0 ml a 50 ml di produzione di gas.

Appendice 3

Esempio di curva di degradazione (aumento cumulativo netto della pressione)

Appendice 4

Esempio di schede dati per la prova di biodegradazione anaerobica — Schede dati per la sostanza in esame

Laboratorio: Sostanza in esame: Test n.:

Temperatura di prova (°C): Volume dello spazio di testa (V_h): (l) Volume del liquido (V_l): (l)

Carbonio nella sostanza in esame C_{cv} : (mg/l) m_v (l): (mg)

(¹) Carbonio nel recipiente di prova, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V$

(2) Carbonio nello spazio di testa, m_h (mg) alla temperatura normale di incubazione (35°C): $m_h = 0,468 \Delta p \times V_{hh}$

(³) Biodegradazione calcolata sulla base del gas dello spazio di testa, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

(4) Carbonio nel liquido, ml (mg): $ml = CIC_{net} \times Vl$

(5) Carbonio gassificato totale, mt (mg): mt + ml

(6) Biodegradazione totale, Dt (%): $Dt = (mt \times 100) / mv$

Laboratorio: Sostanza di riferimento: Test n.:

Temperatura di prova (°C): Volume dello spazio di testa (V_b): (l) Volume del liquido (V_1): (l)

Carbonio nella sostanza di riferimento C_{c_v} (mg/l): m_v⁽¹⁾ (mg):

⁽¹⁾ Carbonio nel recipiente di prova, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_1$

(2) Carbonio nello spazio di testa, m_h (mg) alla temperatura normale di incubazione (35°C) $m_h = 0,468 \Delta p \times V_h$

⁽³⁾ Biodegradazione calcolata sulla base del gas dello spazio di testa, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

(4) Carbonio nel liquido, m_1 (mg): $m_1 = C_{IC,net} \times V_1$

(5) Carbonio gassificato totale, m_t (mg): $m_t +$

(6) Biodegradazione totale, D_t (%): D_t = (m_t × 100) / m_v

C.44. LISCIVIAZIONE SU COLONNE DI SUOLO

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 312 (2004). Le sostanze chimiche di sintesi possono raggiungere il suolo direttamente, a seguito di un'applicazione intenzionale (ad es. prodotti agrochimici) o indirettamente (ad es. via le acque reflue → i fanghi di depurazione → il suolo o l'aria → i depositi secchi/umidi). Per la valutazione dei rischi associati a tali sostanze chimiche, è importante valutare il loro potenziale di trasformazione nel suolo e di migrazione (lisciviazione) verso i strati più profondi del suolo e successivamente fino nelle acque sotterranee.
2. Esistono diversi metodi per misurare il potenziale di lisciviazione delle sostanze chimiche nel suolo in condizioni controllate di laboratorio: cromatografia del suolo su strato sottile, cromatografia del suolo su strato spesso, cromatografia su colonna di suolo e le misurazioni di adsorbimento/desorbimento (1) (2). Per le sostanze chimiche non ionizzate, il coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua (P_{ow}) consente una prima stima del loro potenziale di adsorbimento e di lisciviazione (3) (4) (5).
3. Il metodo descritto nel presente capitolo si basa sulla cromatografia su colonne di suolo in un suolo disturbato (cfr. le definizioni riportate nell'appendice 1). Si effettuano due tipi di esperimenti per stabilire i) il potenziale di lisciviazione della sostanza chimica in esame, e ii) il potenziale di lisciviazione dei prodotti di trasformazione (studio con residui stagionati) nei suoli in condizioni controllate di laboratorio (1). Il metodo di prova è basato su metodi esistenti (6) (7) (8) (9) (10) (11).
4. Nell'ambito di un seminario dell'OCSE sulla selezione dei suoli/sedimenti, tenutosi a Belgirate (Italia) nel 1995 (12), sono stati stabiliti il numero e il tipo di suoli da utilizzare nel presente metodo di prova. Nella stessa occasione sono state formulate raccomandazioni in materia di prelievo, trattamento e conservazione dei campioni di suolo destinati ad esperimenti di lisciviazione.

PRINCIPIO DELLA PROVA

5. Si riempiono di suolo delle colonne di un materiale inerte adeguato (ad es. vetro, acciaio inossidabile, alluminio, teflon, PVC ecc.) che poi sono saturate e equilibrate con una soluzione di "pioggia artificiale" (per le definizioni, cfr. appendice 1) e lasciate scolare. In seguito la superficie di ciascuna colonna di suolo è trattata con la sostanza chimica in esame e/o con residui stagionati della sostanza in questione. Successivamente si aspergono le colonne di suolo con la pioggia artificiale e viene raccolto il percolato. Dopo la lisciviazione il suolo viene estratto dalle colonne e sezionato in un numero di segmenti adeguato, in funzione delle informazioni che si vogliono trarre dallo studio. Vengono poi analizzati i segmenti di suolo e il percolato per individuare la sostanza chimica in esame e, se del caso, i prodotti di trasformazione o altre sostanze chimiche che rivestono interesse.

APPLICABILITÀ DEL METODO DI PROVA

6. Il metodo di prova è applicabile alle sostanze chimiche in esame (non marcate o radiomarcate: ad es. con¹⁴C) per le quali esiste un metodo di analisi sufficientemente accurato e sensibile. Il metodo di prova non è adatto alle sostanze chimiche volatili nel suolo e nell'acqua che non restano nel suolo e/o nel percolato alle condizioni del presente metodo di prova.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA CHIMICA IN ESAME

7. Si possono utilizzare sostanze chimiche non marcate o radiomarcate per misurare il comportamento alla lisciviazione nelle colonne di suolo. Lo studio della lisciviazione dei prodotti di trasformazione (residui stagionati della sostanza chimica in esame) e le determinazioni dei bilanci di massa presuppongono l'utilizzo di materiale radiomarcato. Si raccomanda la marcatura con ¹⁴C ma possono essere utili anche altri isotopi, come ¹³C, ¹⁵N, ³H, ³²P. Nei limiti del possibile, la marcatura va posizionata nella parte o nelle parti più stabili della molecola. La sostanza chimica in esame deve avere una purezza minima del 95 %.
8. La maggior parte delle sostanze chimiche vanno applicate sotto forma di un'unica sostanza. Nel caso delle sostanze attive dei prodotti fitosanitari, invece, possono essere utilizzati prodotti formulati per lo studio della lisciviazione della sostanza madre in esame; le prove con questi prodotti sono indispensabili se la miscela rischia di incidere sul tasso di rilascio (ad esempio formulazioni granulari o a rilascio controllato). Per quanto riguarda i requisiti specifici della miscela ai fini del disegno sperimentale, può essere utile consultare le autorità di regolamentazione prima di svolgere la prova. Per gli studi di lisciviazione di residui stagionati, occorre utilizzare la sostanza madre in esame pura.

(1) Gli studi di lisciviazione su colonna effettuati su prodotti fitosanitari possono fornire informazioni sulla mobilità di una sostanza e dei suoi prodotti di trasformazione e possono integrare gli studi di assorbimento in lotti.

9. Prima di effettuare le prove di lisciviazione su colonne di suolo occorre disporre delle seguenti informazioni sulla sostanza chimica in esame:
 - 1) solubilità in acqua [metodo di prova A.6] (13);
 - 2) solubilità in solventi organici;
 - 3) pressione di vapore [metodo di prova A.4] (13) e costante di Henry;
 - 4) coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua [metodi di prova A.8 e A.24] (13);
 - 5) coefficiente di adsorbimento (K_d , K_f o K_{oc}) [metodo di prova C.8 e/o C.19] (13);
 - 6) idrolisi [metodo di prova C.7] (13);
 - 7) costante di dissociazione (pK_a) [Linea guida 112 dell'OCSE] (25);
 - 8) trasformazione aerobica e anaerobica nel suolo [metodo di prova C.23] (13).

Nota: Nelle rispettive relazioni sulle prove occorre precisare a quale temperatura sono state effettuate le misurazioni.

10. La quantità di sostanza chimica in esame applicata alle colonne di suolo deve consentire di individuare, in ogni singolo segmento, almeno lo 0,5 % della dose applicata. Per le sostanze chimiche attive nei prodotti fitosanitari, la quantità applicata delle sostanza chimica in esame può corrispondere alla dose massima raccomandata (applicazione unica).
11. Occorre disporre di un metodo analitico adeguato di comprovata accuratezza, precisione e sensibilità per la quantificazione, nel suolo e nel percolato, della sostanza chimica in esame e, se del caso, dei suoi prodotti di trasformazione. Occorre inoltre conoscere il limite di rivelabilità della sostanza in esame e dei suoi principali prodotti di trasformazione (di norma almeno tutti i prodotti osservati negli studi delle vie di trasformazione la cui concentrazione è $\geq 10\%$ della dose applicata, ma preferibilmente tutti i prodotti di trasformazione che rivestono interesse) (cfr. paragrafo 17).

SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

12. Per valutare la mobilità relativa della sostanza chimica in esame nel suolo, occorre utilizzare sostanze chimiche di riferimento il cui comportamento di lisciviazione è noto, come l'atrazina o il monuron, che possono essere considerate sostanze moderatamente soggette a lisciviazione nel suolo (1) (8) (11). Al fine di confermare le proprietà idrodinamiche della colonna di suolo, potrebbe inoltre essere utile utilizzare una sostanza chimica di riferimento polare, non degradabile e non sorbente (trizio, bromuro, fluoresceina, eosina) per seguire il movimento dell'acqua nella colonna.
13. L'utilizzo di sostanze chimiche che costituiscono standard chimici potrebbe essere utile per caratterizzare e/o identificare i prodotti di trasformazione individuati nei segmenti di suolo e nei percolati mediante cromatografia, spettroscopia o altri metodi adeguati.

DEFINIZIONI E UNITÀ

14. Cfr. appendice 1.

CRITERI DI QUALITÀ

Recupero

15. Sommando le percentuali della sostanza chimica in esame presenti nei segmenti di suolo e nel percolato della colonna dopo la lisciviazione si ottiene il recupero di una prova di lisciviazione. Il tasso di recupero dovrebbe variare tra il 90 e il 110 % per le sostanze chimiche radiomarcate (11) e dal 70 al 110 % per le sostanze chimiche non marcate (8).

Ripetibilità e sensibilità del metodo analitico

16. La ripetibilità del metodo analitico per la quantificazione della sostanza di prova e i prodotti di trasformazione può essere verificata attraverso una doppia analisi dello stesso estratto di un segmento del suolo o del percolato (cfr. paragrafo 11).

17. Il limite di rivelabilità (LOD) del metodo analitico per la sostanza chimica in esame e i prodotti di trasformazione deve essere pari ad almeno lo $0,01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ in ciascun segmento del suolo o del percolato (come sostanza in esame) o lo 0,5 % della dose applicata in qualsiasi segmento, in funzione di quale sia inferiore. Il limite di quantificazione (LOQ) deve essere specificato.

DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

Sistema di prova

18. Per la prova si utilizzano colonne di lisciviazione (sezionabili o no) in un materiale inerte adeguato (vetro, acciaio inossidabile, alluminio, Teflon, PVC ecc.) con un diametro interno di almeno 4 cm e alte almeno 35 cm. Occorrerà accertarsi che la sostanza in esame e/o i suoi prodotti di trasformazione non interagiscono con i materiali della colonna. L'appendice 2 contiene un esempio adeguato di una colonna sezionabile e di una colonna non sezionabile.
19. Per riempire e compattare le colonne di suolo si utilizzano un cucchiaio, uno stantuffo e un apparecchio di vibrazione.
20. Per l'applicazione di pioggia artificiale sulle colonne di suolo sono utilizzati pompe a pistone o peristaltiche, doccette, bottiglie di Mariotte o semplici imbuti separatori.

Apparecchiature di laboratorio e sostanze chimiche

21. È necessario disporre di un'attrezzatura standard da laboratorio, e in particolare:
 - (1) strumentazione analitica quale apparecchi per gascromatografia gas-liquido (GLC), cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC), cromatografia su strato sottile (TLC), compresi gli adeguati sistemi di rilevazione per l'analisi delle sostanze chimiche marcate e non marcate, o per il metodo di diluizione isotopica inversa;
 - (2) strumenti di identificazione (quali ad esempio spettrometria di massa (MS), gascromatografia con spettrometria di massa (GC-MS), cromatografia liquida ad alta risoluzione con spettrometria di massa (HPLC-MS), risonanza magnetica nucleare (NMR) ecc.);
 - (3) rivelatore a scintillazione a liquido per la sostanza chimica radiomarcata in esame;
 - (4) dispositivo di ossidazione per la combustione del materiale marcato;
 - (5) apparecchio di estrazione (per esempio provette da centrifuga per l'estrazione a freddo e estrattore Soxhlet per l'estrazione continua a riflusso);
 - (6) strumentazione per la concentrazione di soluzioni e estratti (ad es. evaporatore rotante).
22. Le sostanze chimiche utilizzate comprendono: solventi organici di grado analitico, quali acetone, metanolo ecc.; liquido di scintillazione; soluzione di 0,01 M di CaCl_2 in acqua distillata o deionizzata (= pioggia artificiale).

Sostanza chimica in esame

23. Per applicare la sostanza chimica in esame alla colonna di suolo, occorre scioglierla in acqua (deionizzata o distillata). Se la sostanza chimica in esame è scarsamente solubile in acqua, può essere applicata incorporandola in un prodotto formulato (se necessario previa sospensione o emulsione in acqua) o sciogliendola in un solvente organico. Qualora si utilizzi un solvente organico, il suo volume dovrebbe essere ridotto al minimo e evaporato dalla superficie della colonna di suolo prima dell'inizio della lisciviazione. Le formulazioni solide, come i granuli, dovrebbero essere applicate in forma solida senza acqua; per consentire una ripartizione più adeguata sulla superficie della colonna di suolo, prima dell'applicazione il prodotto formulato può essere mescolato con una piccola quantità di sabbia di quarzo (ad esempio 1 g).
24. Per poter rilevare in ogni singolo segmento almeno lo 0,5 % della dose applicata, è opportuno applicare sulle colonne di suolo una quantità sufficiente della sostanza chimica in esame. Per le sostanze chimiche attive dei prodotti fitosanitari, la quantità può corrispondere alla dose massima raccomandata (applicazione unica) e, sia per la lisciviazione della sostanza madre che per quella dei residui stagionati, deve essere commisurata alla superficie della colonna di suolo utilizzata (¹).

(¹) La quantità da applicare alle colonne di suolo cilindriche può essere calcolata ponendo la formula seguente:

$$M [\mu\text{g}] = \frac{A [\text{kg}/\text{ha}] \cdot 10^9 [\mu\text{g}/\text{kg}] \cdot d^2 [\text{cm}^2] \cdot \pi}{10^8 [\text{cm}^2/\text{ha}] \cdot 4}$$

dove:

M = quantità applicata per colonna [μg]

A = tasso di applicazione [$\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$]

d = diametro della colonna di suolo [cm]

π = 3,14

Sostanza chimica di riferimento

25. Negli esperimenti di lisciviazione occorre utilizzare una sostanza chimica di riferimento (cfr. paragrafo 12). Questa sostanza dovrebbe essere applicata alla superficie della colonna di suolo con le stesse modalità della sostanza chimica in esame, in una quantità che consenta un'adeguata rivelazione, come standard interno insieme alla sostanza chimica in esame sulla stessa colonna di suolo, o separatamente su un'altra colonna di suolo. È preferibile applicare le due sostanze chimiche sulla stessa colonna, a meno che le due sostanze siano marcate nello stesso modo.

Suoli

Selezione del suolo

26. Per gli studi di lisciviazione con la sostanza chimica madre, è opportuno utilizzare 3 o 4 suoli con pH, tenore di carbonio organico e tessitura diversi (12). La tabella 1 qui di seguito contiene delle indicazioni in merito alla selezione dei suoli destinati alle prove di lisciviazione. Per le sostanze chimiche in esame ionizzabili, i suoli scelti devono coprire una vasta gamma di pH, in modo da valutare la mobilità della sostanza chimica nelle forme ionizzata e non ionizzata; almeno 3 suoli devono avere un pH al quale la sostanza di prova si presenta nella sua forma mobile.

Tabella 1

Indicazioni per la scelta dei suoli per studi di lisciviazione

N. del suolo	Valore del pH	Carbonio organico %	Tenore di argilla %	Tipo di tessitura (*)
1	> 7,5	3,5 - 5,0	20 - 40	franco argilloso
2	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15 - 25	franco limoso
3	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15 - 30	franco
4	< 4,0 - 6,0 §	< 0,5 - 1,5 § ‡	< 10 - 15 §	sabbioso franco
5	< 4,5	> 10 #	< 10	sabbioso franco/sabbioso

(*) secondo le classificazioni della FAO e dell'USDA (14).

§ Le variabili corrispondenti dovrebbero preferibilmente situarsi nella gamma di valori indicata. Se, tuttavia, si verificano difficoltà a reperire il suolo adeguato, sono ammessi valori al di sotto del minimo indicato.

‡ I suoli con tenore di carbonio organico inferiore allo 0,3 % possono perturbare la correlazione tra il tenore di materiale organico e l'adsorbimento. Pertanto, si raccomanda di utilizzare suoli con un tenore di carbonio organico pari almeno allo 0,3 %.

I suoli caratterizzati da un tenore di carbonio molto elevato (ad es. >10 %) potrebbero non essere accettabili per legge, ad es. per motivi di registrazione di pesticidi.

27. Talvolta è necessario ricorrere ad altri tipi di suolo per rappresentare regioni più fredde, temperate e tropicali. Se si opta per altri tipi di suolo, questi devono essere caratterizzati dagli stessi parametri e dalle stesse variazioni di proprietà dei suoli descritti nelle indicazioni per la selezione dei suoli destinati agli studi della lisciviazione (cfr. tabella 1 di cui sopra), anche se non corrispondono esattamente ai criteri.
28. Gli studi di lisciviazione con "residui stagionati" devono essere svolti su un unico tipo di suolo (12), con un tenore di sabbia > 70 % e un tenore di carbonio organico tra 0,5 e 1,5 % (ad esempio il suolo n. 4 nella tabella 1). Per ottenere dati sui prodotti di trasformazione a volte si devono utilizzare più tipi di suolo.

29. Tutti i suoli dovrebbero essere caratterizzati almeno in termini di tessitura [% di sabbia, % di limo, % di argilla, secondo i sistemi di classificazione della FAO e dell'USDA (14)], pH, capacità di scambio cationico, tenore di carbonio organico, densità apparente (per suoli disturbati) e capacità di ritenzione idrica. La misurazione della biomassa microbica è necessaria solo nel caso di suoli utilizzati nel periodo di incubazione/stagionatura prima dell'esperimento di lisciviazione. Informazioni su ulteriori proprietà del suolo (ad esempio classificazione del suolo, mineralogia dell'argilla, superficie specifica) possono essere utili per interpretare i risultati di questo studio. Per la determinazione delle caratteristiche del suolo, possono essere utilizzati i metodi raccomandati di cui ai riferimenti (15) (16) (17) (18) (19).

Prelievo e conservazione dei suoli

30. I suoli devono essere asportati dallo strato superiore (orizzonte A) fino ad una profondità massima di 20 cm e ripuliti dai residui di vegetazione, macrofauna e pietre. I suoli (ad eccezione di quelli utilizzati per "stagionare" la sostanza chimica in esame) sono essiccati all'aria a temperatura ambiente (di preferenza fra 20 e 25 °C). La disaggregazione deve essere effettuata applicando la minima forza possibile, in modo da non alterare troppo la tessitura originale del terreno. I terreni sono setacciati mediante un setaccio a maglie di ≤ 2 mm. Si raccomanda un'accurata omogeneizzazione, in quanto ciò migliora la riproducibilità dei risultati. Prima dell'uso i campioni di suoli possono essere conservati a temperatura ambiente e essiccati all'aria (12). Per la conservazione non sono previsti particolari limiti di tempo, ma i suoli conservati per più di tre anni saranno rianalizzati prima dell'impiego, per verificare il tenore di carbonio organico e il pH.
31. Si dovrebbe disporre di informazioni dettagliate sulla storia del sito in cui i suoli in esame sono raccolti. Queste informazioni comprendono l'esatta ubicazione [definita precisamente secondo le coordinate UTM (*Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum*) o attraverso le coordinate geografiche], il manto vegetale, i trattamenti con prodotti chimici fitosanitari, i trattamenti con fertilizzanti organici e inorganici, laggiunta di materiali biologici o le contaminazioni accidentali (12). I suoli trattati con la sostanza chimica in esame o con i suoi analoghi strutturali nei quattro anni precedenti non dovrebbero essere utilizzati per studi di lisciviazione.

Condizioni della prova

32. Durante la prova, le colonne di suolo destinate alla lisciviazione devono essere conservate al buio e a temperatura ambiente, purché tale temperatura sia mantenuta sempre entro un intervallo di ± 2 °C. Le temperature raccomandate si situano tra 18 e 25 °C.
33. Sulla superficie delle colonne di suolo occorre applicare costantemente pioggia artificiale (0,01 M di CaCl₂), per una quantità complessiva di 200 mm nel corso di 48 ore ⁽¹⁾; questo valore corrisponde all'applicazione di 251 ml su una colonna con un diametro interno di 4 cm. Se necessario per la finalità della prova, si possono applicare quantità diverse di pioggia artificiale e per periodi più lunghi.

Esecuzione della prova

Lisciviazione con la sostanza madre in esame

34. Almeno due colonne di lisciviazione (duplicati) sono riempite con suolo non trattato, essiccato all'aria e setacciato (< 2 mm) fino ad un'altezza di circa 30 cm. Per ottenere una compressione omogenea, il suolo viene introdotto in piccole quantità con un cucchiaio, compattato con un pistone sottoponendo nello stesso tempo le colonne a piccole vibrazioni fino a quando la parte superiore delle colonne di suolo non affonda più. La riproducibilità dei risultati ottenuti con le colonne di lisciviazione è subordinata alla compattazione uniforme del suolo nelle colonne. Per maggiori informazioni sulle tecniche di riempimento delle colonne, cfr. riferimenti (20) (21) e (22). Per garantire la riproducibilità del procedimento di riempimento, si determina il peso totale del suolo introdotto nelle colonne ⁽²⁾; il peso delle colonne destinate alla riproduzione della prova (duplicato) deve essere simile.

⁽¹⁾) corrisponde ad un elevatissimo livello di precipitazioni. La media annuale delle precipitazioni in Europa centrale è, ad esempio, dell'ordine di 800-1 000 mm.

⁽²⁾) Esempi di densità apparente per suoli disturbati:
suolo sabbioso: 1,66 g · ml⁻¹;
suolo sabbioso: franco 1,17 g · ml⁻¹;
suolo franco: 1,58 g · ml⁻¹;
suolo limoso: 1,11 · g ml⁻¹.

35. Dopo il riempimento, le colonne di suolo sono pre-inumidite con pioggia artificiale (0,01 M di CaCl_2) dal basso verso l'alto, in modo che l'acqua elimini l'aria presente nei pori del suolo. Successivamente si lascia che le colonne di suolo raggiungano l'equilibrio e l'acqua in eccesso è eliminata per gravità. Al riferimento (23) sono esaminati vari metodi di saturazione delle colonne.
36. In seguito la sostanza chimica in esame e/o la sostanza chimica di riferimento sono applicate sulle colonne di suolo (cfr. anche i paragrafi da 23 a 25). Per ottenere una distribuzione omogenea le soluzioni, suspensioni o emulsioni della sostanza in esame o di quelle di riferimento dovrebbero essere applicate uniformemente sulla superficie delle colonne di suolo. Se la modalità di applicazione consigliata è l'incorporazione nel suolo, la sostanza chimica in esame deve essere mescolata ad una piccola quantità di suolo (ad esempio 20 g) e aggiunta alla superficie della colonna di suolo.
37. A questo punto la superficie delle colonne di suolo è ricoperta con un dischetto di vetro sinterizzato, perle di vetro, filtri in fibra di vetro o un disco di carta da filtro per distribuire la pioggia artificiale uniformemente su tutta la superficie e evitare che le gocce di pioggia perturbino la superficie del suolo. Quanto più grande è il diametro della colonna tanta più attenzione occorre prestare nell'applicazione della pioggia artificiale sulla colonne di suolo per garantirne una distribuzione uniforme sulla superficie del suolo. Successivamente, con l'aiuto di una pompa a pistone o peristaltica o di un imbuto separatore, la pioggia artificiale è aggiunta goccia a goccia nelle colonne di suolo. È preferibile raccogliere i percolati in frazioni e prender nota dei loro volumi rispettivi ⁽¹⁾.
38. Dopo la lisciviazione, si lasciano sgocciolare le colonne prima di sezionarle in un numero adeguato di segmenti, in funzione delle informazioni che si vogliono ottenere dallo studio. I segmenti sono estratti con solventi o miscele di solventi adeguati e analizzati per determinare la presenza della sostanza chimica di prova e, se del caso, di prodotti di trasformazione, della radioattività totale e della sostanza chimica di riferimento. I percolati o le frazioni di percolato sono sottoposti alle stesse analisi direttamente o dopo essere stati estratti. Quando viene utilizzata una sostanza chimica di prova radiomarcata, devono essere identificate tutte le frazioni contenenti $\geq 10\%$ della radioattività applicata.

Lisciviazione di residui stagionati

39. Un suolo fresco (non precedentemente seccato all'aria) viene trattato con la sostanza chimica in esame radiomarcata ad una dose proporzionale alla superficie delle colonne di suolo (cfr. paragrafo 24) e incubato a condizioni aerobiche come indicato nel metodo di prova C.23 (13). Il periodo di incubazione (invecchiamento) deve essere sufficientemente lungo da consentire di produrre notevoli quantità di prodotti di trasformazione; si raccomanda un periodo di invecchiamento equivalente alla emivita della sostanza in esame ⁽²⁾, ma comunque non superiore a 120 giorni. Prima della lisciviazione, il suolo stagionato è analizzato per stabilire la presenza della sostanza di prova e dei suoi prodotti di trasformazione.
40. Le colonne di lisciviazione sono riempite fino a un'altezza di 28 cm con lo stesso tipo di suolo (essiccato all'aria) usato per l'esperimento di invecchiamento di cui al paragrafo 34 e viene determinato anche il peso totale delle colonne riempite. Le colonne di suolo sono poi pre-inumidite come indicato al paragrafo 35.
41. A questo punto la sostanza chimica di prova e i suoi prodotti di trasformazione sono applicati sulla superficie delle colonne di suolo sotto forma di residui di suolo stagionato (cfr. paragrafo 39) in modo da formare un segmento di suolo di 2 cm. L'altezza totale delle colonne di suolo (suolo non trattato + suolo stagionato) non dovrebbe superare 30 cm (cfr. paragrafo 34).
42. La lisciviazione viene effettuata come indicato al paragrafo 37.
43. Dopo la lisciviazione si analizzano (come indicato al paragrafo 38) i segmenti di suolo e il percolato per individuare la sostanza chimica in esame, i suoi prodotti di trasformazione e la radioattività non estratta. Per stabilire la quantità di residuo stagionato che, dopo la lisciviazione, rimane nello strato superiore di 2 cm, occorre analizzare questo segmento separatamente.

⁽¹⁾ Il volume dei percolati di norma è pari a 230-260 ml corrispondenti a circa il 92-104 % della quantità totale di pioggia artificiale applicata (251 ml) quando si utilizzano colonne di suolo di 4 cm di diametro e 30 cm di altezza.

⁽²⁾ Nel suolo si possono formare più prodotti di trasformazione di interesse che possono comparire in momenti diversi dello studio di trasformazione. In tal caso, potrebbe essere necessario effettuare studi di lisciviazione su residui stagionati di età diverse.

DATI E RELAZIONE**Trattamento dei risultati**

44. Le quantità di sostanza chimica in esame, prodotti di trasformazione, prodotti non estraibili e, se del caso, di sostanza chimica di riferimento devono essere espresse in percentuale della dose iniziale applicata, per ciascun segmento di suolo e frazione di percolato. Per ciascuna colonna, si traccia una rappresentazione grafica delle percentuali individuate in funzione della profondità del suolo.
45. Quando uno studio di lisciviazione su colonna comprende una sostanza chimica di riferimento, la lisciviazione di una sostanza chimica può essere valutata su una scala relativa, avvalendosi di fattori di mobilità relativi (RMF; cfr. le definizioni di cui all'appendice 3) (1) (11) che consentono il confronto tra i dati relativi alla lisciviazione di varie sostanze chimiche ottenuti con diversi tipi di suolo. L'appendice 3 contiene esempi di valori di RMF per vari prodotti fitosanitari.
46. Le stime del K_{oc} (coefficiente di adsorbimento normalizzato per il carbonio organico) e del K_{om} (coefficiente di distribuzione normalizzato per la sostanza organica) possono essere ottenute dai risultati della lisciviazione su colonna, in funzione della distanza media di lisciviazione o delle correlazioni stabilite tra RMF e K_{om} o K_{oc} (4) rispettivamente o mediante l'applicazione di una semplice teoria chromatografica (24). Tuttavia, questo ultimo metodo deve essere usato con prudenza, in particolare considerando che il processo di lisciviazione non comporta esclusivamente condizioni di saturazione, ma piuttosto condizioni di insaturazione.

Interpretazione dei risultati

47. Gli studi di lisciviazione su colonna descritti nel presente metodo permettono di determinare il potenziale di lisciviazione o di mobilità nel suolo della sostanza chimica in esame (nello studio di lisciviazione della sostanza madre) e/o dei suoi prodotti di trasformazione (nello studio di lisciviazione dei residui stagionati). Queste prove non consentono di prevedere quantitativamente il comportamento alla lisciviazione in condizioni reali, ma possono essere utilizzate per confrontare la "tendenza alla lisciviazione" di una sostanza chimica rispetto ad altre sostanze il cui comportamento alla lisciviazione è noto (24). Allo stesso modo, non servono a misurare quantitativamente la percentuale della sostanza chimica applicata che potrebbe arrivare nelle acque sotterranee (11). Tuttavia, i risultati degli studi di lisciviazione su colonna possono dare indicazioni utili sull'opportunità di svolgere prove aggiuntive sul campo o semi-campo per le sostanze chimiche che presentano un elevato potenziale di mobilità nelle prove di laboratorio.

Relazione sulla prova

48. La relazione deve contenere:

Sostanza chimica in esame e sostanza di riferimento (se impiegata):

- nome comune, nome chimico (nomenclatura IUPAC e CAS), numero CAS, struttura chimica (con indicazione della posizione della marcatura in caso di sostanze radiomarcate) e proprietà fisico-chimiche pertinenti;
- grado di purezza (presenza di impurità) della sostanza chimica in esame;
- purezza radiochimica della sostanza marcata e attività specifica (se pertinente).

Suoli utilizzati nella prova:

- dettagli relativi al sito di prelievo;
- proprietà del suolo, quali pH, tenore di carbonio organico e di argilla, tessitura e densità apparente (per suoli disturbati);
- attività microbica del suolo (unicamente per il suolo utilizzato per invecchiare la sostanza in esame);
- durata e condizioni della conservazione del suolo.

Condizioni della prova:

- date di realizzazione degli studi;
- lunghezza e diametro delle colonne di lisciviazione;
- peso totale del suolo contenuto nelle colonne;
- quantità della sostanza in esame e, se del caso, della sostanza di riferimento applicate;

- quantità, frequenza e durata dell'applicazione della pioggia artificiale;
- temperatura della configurazione sperimentale;
- numero di repliche (almeno due);
- metodi di analisi della sostanza chimica in esame, dei prodotti di trasformazione e, se del caso, della sostanza chimica di riferimento nei vari segmenti di suolo e nei percolati;
- metodi di caratterizzazione e identificazione dei prodotti di trasformazione nei segmenti di suolo e nei percolati.

Risultati delle prove:

- tabelle dei risultati espressi in concentrazioni e in % della dose applicata per i segmenti di suolo e i percolati;
- bilancio di massa, se del caso;
- volumi di percolato;
- distanze di lisciviazione e, se del caso, fattori di mobilità relativi;
- grafico della % rinvenuta nei segmenti di suolo in funzione della loro profondità;
- discussione e interpretazione dei risultati.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Guth, J.A., Burkhard, N. and Eberle, D.O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.
- (2) Russel, M.H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals — T.R. Roberts and P.C. Kearney, Eds.). J. Wiley & Sons.
- (3) Briggs, G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, 1050-1059.
- (4) Chiou, C.T., Porter, P.E. and Schmedding, D.W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227 -231.
- (5) Guth, J.A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im BODEN. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26-33.
- (6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- (7) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- (8) Allegato I della direttiva 95/36/CE della Commissione, del 14 luglio 1995, che modifica la direttiva 91/414/CEE del Consiglio relativa all'immissione in commercio dei prodotti fitosanitari, GU L 172 del 22.7.1995, pag. 8.
- (9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.
- (11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- (12) OCSE (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italia, 18-20 gennaio 1995.

(13) I seguenti capitoli del presente allegato:

Capitolo A.4 — Tensione di vapore

Capitolo A.6 — Solubilità in acqua

Capitolo A.8 — Coefficiente di ripartizione, metodo del dibattimento in pallone

Capitolo A.24 — Coefficiente di ripartizione, metodo HPLC

Capitolo C.7 — Degradazione — degradazione abiotica: idrolisi in funzione del pH

Capitolo C.18 — Adsorbimento/desorbimento: metodo discontinuo all'equilibrio

Capitolo C.23 — Trasformazione aerobica e anaerobica nel suolo

(14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).

(15) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods (A. Klute, Ed.). Agronomy Series No. 9, 2nd Edition.

(16) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(17) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.

(18) Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(19) Weber, J.B. and Peepoer, T.F. (1977). In Research Methods in Weed Science, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73-78.

(20) Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J. and Sartori, J.L. (1986). In Research Methods in Weed Science, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190-200.

(21) Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J. and Sartori, J.L. (1986). In Research Methods in Weed Science, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190-200.

(22) Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Amer. J. 60(1): 49-53.

(23) Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. — A review. J. Contam. Hydrol. 7, 177-217.

(24) Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115-133. Plenum Press, New York.

(25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OECD, Paris.

Appendice 1

Definizioni e unità

Residuo di suolo stagionato: Sostanza chimica in esame e prodotti di trasformazione presenti nel suolo dopo l'applicazione e al termine di un periodo abbastanza lungo per consentire ai processi di trasporto, adsorbimento, metabolici e di dissipazione di modificare la distribuzione e la natura chimica di parte della sostanza chimica applicata (1).

Pioggia artificiale: Soluzione 0,01 M di CaCl₂ nell'acqua distillata o deionizzata.

Distanza media di lisciviazione: Parte finale di una sezione di suolo in cui il recupero accumulato della sostanza chimica corrisponde al 50 % della sostanza chimica in esame recuperata totale [esperimento di lisciviazione normale], o (parte finale di una sezione di suolo in cui il recupero accumulato della sostanza chimica corrisponde al 50 % della sostanza chimica in esame recuperata totale) — ((spessore dello strato di residui stagionati)/2) [studio di lisciviazione dei residui stagionati]

Sostanza chimica: Sostanza o miscela.

Percolato: Fase acquosa dopo percolazione attraverso un profilo di suolo o una colonna di suolo (1).

Lisciviazione: Processo in cui un prodotto chimico si sposta verso il basso attraverso un profilo di suolo o una colonna di suolo (1).

Distanza di lisciviazione: Segmento di suolo più profondo in cui, dopo il processo di lisciviazione, si trova ≥ 0,5 % della sostanza chimica in esame applicata o dei residui stagionati (equivalente alla profondità di penetrazione).

Limite di rivelabilità (LOD) e limite di quantificazione (LOQ): Il limite di rivelabilità (LOD) è la concentrazione di una sostanza chimica al di sotto della quale non è possibile distinguere la sostanza in questione dagli artefatti analitici. Il limite di quantificazione (LOQ) è la concentrazione di una sostanza chimica al di sotto della quale non è possibile determinarne la concentrazione con un'accuratezza accettabile.

Fattore di mobilità relativa (RMF): (distanza di lisciviazione della sostanza chimica in esame (cm)) / (distanza di lisciviazione della sostanza chimica di riferimento (cm))

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata in applicazione del presente metodo di prova.

Prodotto di trasformazione: Tutte le sostanze chimiche derivanti da reazioni di trasformazione biotica o abiotica della sostanza chimica di prova compresa la CO₂ e i prodotti legati ai residui.

Suolo: Miscela di componenti chimici minerali e organici, questi ultimi contenenti composti ad elevato tenore di carbonio e di azoto e ad elevato peso molecolare, popolati da piccoli organismi (per lo più microorganismi). Il suolo può presentarsi in due stati diversi:

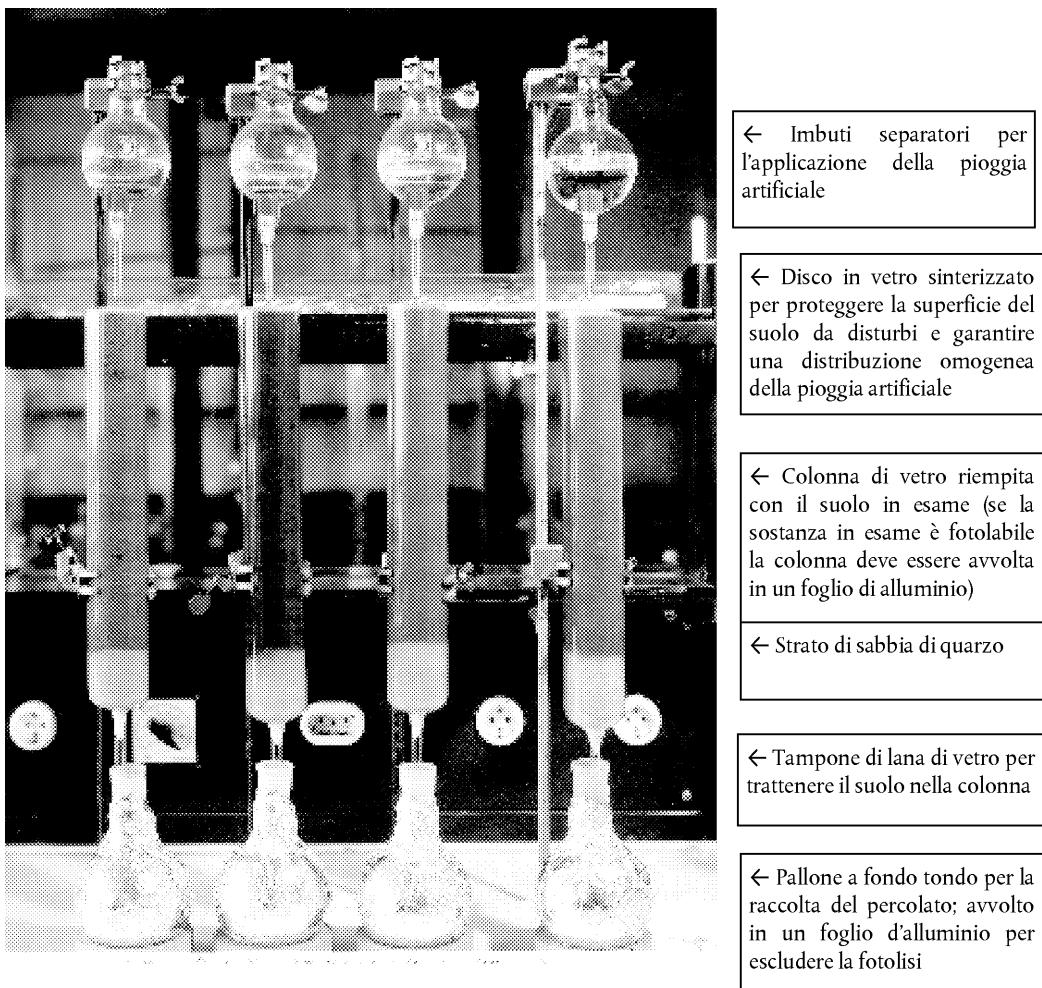
- non disturbato, così come si è costituito nel tempo, in strati caratteristici di vari tipi di suolo;
- disturbato, come di solito si trova nei seminativi o quando mediante scavo sono stati prelevati dei campioni successivamente utilizzati nel presente metodo di prova (2).

- (1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167-1193.
- (2) Linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 304 A: Biodegradabilità intrinseca nel suolo (adottata il 12 maggio 1981).

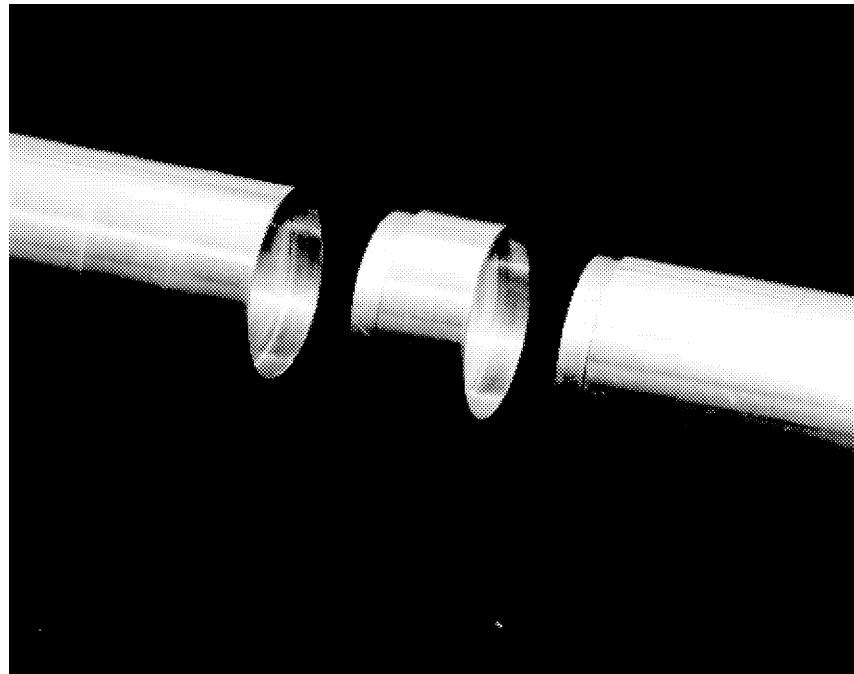
Appendice 2

Figura 1

**Esempio di colonne di lisciviazione in vetro non sezionabili
lunghezza 35 cm e diametro interno di 5 cm (1)**



- (1) Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden — 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

*Figura 2***Esempio di una colonna metallica sezionabile con diametro interno di 4 cm (1)**

- (1) Burkhard, N., Eberle D.O. and Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203-213.
-

Appendice 3

Esempi di fattori di mobilità relativa (*) (RMF) per una serie di prodotti fitosanitari (1) (2) e classi di mobilità corrispondenti +

Intervallo di RMF	Sostanza chimica (RMF)	Classe di mobilità
≤ 0,15	Parathion (< 0,15), fluorodifen (0,15)	I immobile
0,15 - 0,8	Profenofos (0,18), propiconazolo (0,23), diazinon (0,28), diuron (0,38), terbutilazina (0,52), metidation (0,56), prometrina (0,59), propazina (0,64), alacloro (0,66), metolacloro (0,68)	II leggermente mobile
0,8 - 1,3	Monuron (**) (1,00), atrazina (1,03), simazina (1,04), fluometuron (1,18)	III moderatamente mobile
1,3 - 2,5	Prometone (1,67), cianazina (1,85), bromacil (1,91), carbutilato (1,98)	IV abbastanza mobile
2,5 - 5,0	Carbofuran (3,00), dioxacarb (4,33)	V mobile
> 5,0	Monocrotofos (> 5,0), dicrotofos (> 5,0)	VI molto mobile

(*) il fattore di mobilità relativo è calcolato con la seguente formula (3):

$$\text{RMF} = \frac{\text{distanza di lisciviazione della sostanza chimica in esame (cm)}}{\text{distanza di lisciviazione della sostanza di riferimento (cm)}}$$

(**) Sostanza chimica di riferimento

+ Altri sistemi di classificazione della mobilità di una sostanza chimica nel suolo si fondano sui valori R_f della cromatografia su strato sottile del suolo (4) e sui valori di K_{oc} (5)(6).

- (1) Guth, J.A. (1985). Adsorbimento/desorbimento. In Joint International Symposium "Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment." Canterbury, UK, 1-3 July 1985.
- (2) Guth, J.A. and Hörmann, W.D. (1987). Problematik und relevanz von pflanzenschutzmittel-spuren im Grund (trink-) Wasser. Schr.reihe Verein wabolu, 68, 91-106.
- (3) Harris, C.I. (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214-216.
- (4) Helling, C.S. (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, 743-748.
- (5) McCall, P.J., Laskowski, D.A., Swann, R.L. and Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.
- (6) Hollis, J.M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, 165-174.

C.45. STIMA DELLE EMISSIONI NELL'AMBIENTE PROVENIENTI DAL LEGNO TRATTATO CON AGENTI DI CONSERVAZIONE: METODO DI LABORATORIO PER GLI ARTICOLI IN LEGNO SENZA RIVESTIMENTO IN CONTATTO CON L'ACQUA DOLCE O L'ACQUA DI MARE

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 313 (2007). Le emissioni nell'ambiente provenienti dal legno trattato con agenti conservanti devono essere quantificate per consentire una valutazione dei rischi ambientali legati al legno trattato. Questo metodo di prova descrive un metodo di laboratorio per la stima delle emissioni prodotte dal legno trattato con agenti conservanti in due situazioni in cui le emissioni generate potrebbero penetrare nell'ambiente:
 - le emissioni provenienti da legno trattato a contatto con acqua dolce; le emissioni provenienti dalla superficie del legno trattato potrebbero penetrare nell'acqua;
 - le emissioni provenienti da legno trattato a contatto con l'acqua di mare; le emissioni provenienti dalla superficie del legno trattato potrebbero penetrare nell'acqua di mare.
2. Il presente metodo di prova si applica alle emissioni provenienti dal legno e da articoli in legno privi di rivestimento che entrano in contatto con acqua dolce o acqua di mare. Le classi di utilizzo, impiegate a livello internazionale, stabiliscono le categorie di pericoli biologici cui gli articoli trattati sono soggetti. Le classi di utilizzo definiscono anche la situazione in cui l'articolo trattato è utilizzato e determinano i compatti ambientali (aria, acqua, suolo) soggetti ad un potenziale rischio dovuto al legno trattato con agenti conservanti.
3. Il metodo di prova è una procedura di laboratorio per ottenere campioni (ambiente di emissione) dell'acqua nella quale il legno trattato è immerso, a intervalli di esposizione crescenti. La quantità di emissioni nell'ambiente di emissione è connessa alla superficie del legno e alla durata dell'esposizione, al fine di determinare un flusso in mg/m²/giorno. Si può così stimare il flusso (tasso di lisciviazione) dopo periodi sempre più lunghi di esposizione.
4. La quantità di emissioni può essere utilizzata nella valutazione dei rischi ambientali legati al legno trattato.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

5. Il meccanismo della lisciviazione della superficie del legno con acqua dolce non è ritenuto identico (per natura e intensità) alla lisciviazione di una superficie di legno con acqua di mare. Pertanto, è necessario svolgere uno studio della lisciviazione del legno con acqua di mare applicabile ai prodotti o alle miscele conservanti destinati al trattamento del legno utilizzato in prossimità del mare.
6. Il legno utilizzato in uno studio sul legno trattato con agenti conservanti dovrebbe essere rappresentativo del legno utilizzato in commercio. Dovrebbe essere trattato conformemente alle indicazioni del fabbricante dell'agente conservante e nel rispetto delle norme e delle specifiche appropriate. Prima dell'inizio della prova devono essere specificati i parametri per il condizionamento del legno successivamente al trattamento.
7. I campioni di legno utilizzati devono essere rappresentativi degli articoli esistenti (ad esempio, con riguardo alle specie, densità e altre caratteristiche).
8. La prova può essere effettuata per il legno trattato con processi di penetrazione o di applicazione superficiale o per il legno trattato sottoposto ad un trattamento superficiale obbligatorio supplementare (ad esempio, una pittura, la cui applicazione è obbligatoria per l'uso commerciale del legno).
9. La composizione, la quantità, il pH e la forma fisica dell'acqua sono importanti per determinare la quantità, il contenuto e la natura delle emissioni provenienti dal legno.

PRINCIPIO DELLA PROVA

10. I campioni di legno trattati con l'agente conservante sono immersi in acqua. L'acqua (ambiente di emissione) è raccolta e sottoposta ad analisi chimiche ripetute più volte nel corso dell'esposizione in modo da consentire lo svolgimento di calcoli statistici. I tassi di emissione sono calcolati in mg/m²/giorno in base ai risultati analitici. I periodi di campionamento devono essere registrati. Le prove con campioni non trattati possono essere interrotte se non si individuano valori di fondo nei primi tre punti di rilevamento.

11. L'inclusione nello studio di campioni di legno non trattati consente di stabilire i livelli di fondo delle emissioni associate al legno in questione, non provenienti dal conservante utilizzato.

CRITERI DI QUALITÀ

Accuratezza

12. L'accuratezza del metodo di prova per la stima delle emissioni dipende dalla rappresentatività dei campioni di prova in relazione al legno trattato reperibile in commercio, dalla rappresentatività dell'acqua rispetto all'acqua reale e dalla rappresentatività del regime di esposizione in relazione alle condizioni naturali.
13. L'accuratezza, la precisione e la ripetibilità del metodo analitico dovrebbero essere determinate prima dell'esecuzione della prova.

Riproducibilità

14. Il valore medio è calcolato da tre campioni di acqua raccolti e analizzati ed è considerato come il valore di emissione. La riproducibilità dei risultati in un laboratorio e tra laboratori diversi dipende dal sistema di immersione e dal legno utilizzato per i campioni di prova.

Intervallo di risultati accettabile

15. L'intervallo di risultati di questa prova è accettabile quando la variazione tra i valori più elevati e quelli più bassi è inferiore a un ordine di grandezza.

CONDIZIONI DI PROVA

Acqua

16. Scenari di lisciviazione con acqua dolce: quando si intende valutare un legno esposto all'acqua dolce si raccomanda l'utilizzo di acqua deionizzata (ad es. ASTM D 1193 Tipo II) nella prova di lisciviazione. La temperatura dell'acqua deve essere di 20 °C con una variazione di ± 2 °C e il pH e la temperatura dell'acqua misurati devono essere riportati nella relazione sulla prova. L'analisi dei campioni dell'acqua utilizzata, prelevati prima dell'immersione dei campioni trattati, consente di stimare il tenore delle sostanze chimiche analizzate presenti nell'acqua. Si tratta di un'analisi di controllo per determinare i livelli di fondo delle sostanze chimiche che successivamente saranno analizzate chimicamente.
17. Scenari di lisciviazione con acqua di mare: quando si intende valutare un legno esposto all'acqua di mare si raccomanda l'utilizzo di acqua di mare artificiale (ad es. ASTM D 1141, acqua di mare di sostituzione, senza metalli pesanti) nella prova di lisciviazione. La temperatura dell'acqua deve essere di 20 °C con una variazione di ± 2 °C e il pH e la temperatura dell'acqua misurati devono essere riportati nella relazione sulla prova. L'analisi dei campioni dell'acqua utilizzata, prelevati prima dell'immersione dei campioni trattati, consente di stimare il tenore delle sostanze chimiche analizzate presenti nell'acqua. Si tratta di un controllo per l'analisi dei livelli di fondo delle sostanze chimiche di interesse.

Campioni di legno di prova

18. Per la piena efficacia della prova relativa agli agenti conservanti del legno, la specie di legno deve essere rappresentativa delle specie utilizzate abitualmente. Le specie raccomandate sono *Pinus sylvestris* L. (pino silvestre), *Pinus resinosa* Ait. (pino rosso) o *Pinus spp* (pino). Ulteriori prove possono essere effettuate utilizzando altre specie.
19. Si dovrebbe utilizzare legno a fibre dritte senza nodi, evitando i materiali di aspetto resinoso. Il legno deve essere rappresentativo del legno disponibile in commercio. Si deve prender nota della fonte, della densità e del numero di anelli annuali per 10 mm.
20. Si raccomanda di utilizzare campioni sperimentali di legno suddivisi in gruppi di cinque con dimensioni di cui alla norma EN 113 (25 mm x 50 mm x 15 mm) e le facce longitudinali parallele alle fibre del legno, anche se si possono utilizzare altre dimensioni, ad es. 50 mm x 150 mm x 10 mm. I campioni sperimentali devono essere completamente immersi in acqua e devono essere costituiti al 100 % di alburno. Ogni campione reca un contrassegno specifico in modo da poter essere identificato per l'intera durata della prova.
21. Tutti i campioni devono essere piallati o segati e le superfici non devono essere levigate.

22. Nelle analisi svolte durante la prova occorre utilizzare almeno cinque serie di campioni del legno: tre gruppi di campioni sono trattati con agenti conservanti, un gruppo non è trattato e un gruppo di campioni è destinato alla stima del tenore di umidità prima del trattamento, effettuato per essiccazione in forno. Il numero di campioni preparati deve consentire la selezione di almeno tre gruppi di campioni in cui la ritenzione dell'agente conservante registra uno scarto massimo del 5 % del valore medio dell'insieme dei campioni di prova.
23. Tutti i campioni sono sigillati all'estremità con una sostanza chimica che impedisce la penetrazione del conservante nella fibratura di testa dei campioni di prova o impedisce la lisciviazione attraverso la fibratura di testa. Per l'applicazione del sigillante di testa, è necessario distinguere tra campioni sottoposti ad applicazione superficiale e quelli soggetti a processi di penetrazione. L'applicazione del sigillante di testa deve avvenire prima del trattamento solo in caso di applicazione superficiale.
24. La fibratura di testa deve rimanere aperta durante i trattamenti mediante processi di penetrazione. Pertanto, i campioni devono essere sigillati all'estremità alla fine del periodo di condizionamento. Le emissioni devono essere stimate solo per la superficie longitudinale. I sigillanti dovrebbero essere esaminati e riapplicati se necessario prima d'iniziare la lisciviazione, ma non dopo l'avvio della lisciviazione.

Contenitore per immersione

25. Il contenitore è costituito da materiale inerte ed è di dimensioni tali da poter contenere 5 campioni di legno (conformi alla norma EN 113) in 500 ml di acqua, con un rapporto superficie del legno/volume d'acqua pari a 0,4 cm²/ml.

Supporto dei campioni di prova

26. Il supporto che sostiene i campioni di prova consente il contatto con l'acqua di tutte le superfici del campione esposte.

PROCEDURA PER IL TRATTAMENTO CON UN AGENTE CONSERVANTE

Preparazione dei campioni trattati da sottoporre alla prova

27. Il campione di legno da trattare con il conservante in esame è trattato secondo il metodo indicato per il conservante, ossia un procedimento di penetrazione o di applicazione superficiale mediante immersione, nebulizzazione o applicazione con pennello.

Agenti conservanti da applicare mediante trattamento per penetrazione

28. Occorre preparare una soluzione dell'agente conservante che consente l'assorbimento o la ritenzione volute se applicato mediante il procedimento di penetrazione. Il campione di legno viene pesato e le sue dimensioni misurate. Il trattamento per penetrazione deve essere quello indicato per l'applicazione del conservante per l'utilizzo nella classe di uso 4 o 5. Il campione viene nuovamente pesato dopo il trattamento e la ritenzione del conservante (kg/m³) è calcolata con la seguente equazione:

$$\frac{\text{Massa dopo il trattamento (kg)} - \text{Massa prima del trattamento (kg)}}{\text{Soluzione Concentrazione (m}^3\text{)}} \times \frac{\% \text{ massa (massa/Volume del campione di prova (m}^3\text{))}}{100}$$

29. In questa prova può essere utilizzato anche il legno trattato in un impianto di trattamento industriale (ad esempio mediante impregnazione sotto vuoto e pressione). I procedimenti utilizzati devono essere registrati e la ritenzione del materiale trattato in questo modo deve essere analizzata e registrata.

Conservanti da applicare mediante processi di applicazione superficiale

30. I procedimenti di applicazione superficiale comprendono l'immersione, la nebulizzazione o l'applicazione a pennello dei campioni di legno. Il procedimento è il tasso di applicazione (ad es. litri/m²) sono quelli specificati per l'applicazione superficiale dell'agente conservante.

31. Anche in questo caso, inoltre, il legno trattato in un impianto di trattamento industriale può essere utilizzato nella prova. I procedimenti utilizzati devono essere registrati e la ritenzione del materiale trattato in questo modo deve essere analizzata e registrata.

Condizionamento dei campioni di prova dopo il trattamento

32. Dopo il trattamento, i campioni di prova devono essere condizionati conformemente alle raccomandazioni formulate dal fornitore del prodotto conservante secondo le prescrizioni riportate nell'etichetta o le pratiche di trattamento abituali nell'industria o ai sensi della norma EN 252.

Preparazione e selezione dei campioni di prova

33. Dopo il condizionamento post-trattamento, viene calcolata la ritenzione media del gruppo di campioni e, per la misurazione della lisciviazione, sono selezionate in modo casuale tre serie rappresentative di campioni con una ritenzione che si situa entro il 5 % della media per il gruppo.

PROCEDURA PER LE MISURAZIONI DELLE EMISSIONI DEL CONSERVANTE

Metodo dell'immersione

34. I campioni sono pesati e successivamente immersi totalmente nell'acqua, registrando la data e l'ora dell'operazione. Il contenitore è coperto per ridurre l'evaporazione.
35. L'acqua è sostituita agli intervalli seguenti: 6 ore, 1 giorno, 2 giorni, 4 giorni, 8 giorni, 15 giorni, 22 giorni, 29 giorni (nota: si tratta di tempi totali e non di intervalli tra una sostituzione e l'altra). Occorre registrare l'ora e la data del cambiamento dell'acqua e la massa di acqua recuperata dal contenitore.
36. Dopo ogni cambio di acqua, un campione dell'acqua in cui è stata immersa la serie di campioni è conservato in vista di successive analisi chimiche.
37. La procedura di campionamento consente il calcolo del profilo del quantitativo di emissioni in funzione del tempo. I campioni dovrebbero essere conservati in modo da preservare l'analita, ad esempio, in un frigorifero al buio per ridurre la crescita microbica nel campione prima dell'analisi.

MISURAZIONE DELLE EMISSIONI

Campioni trattati

38. Il principio attivo e/o i prodotti di degradazione/trasformazione pertinenti, se del caso, sono analizzati chimicamente nell'acqua raccolta.

Campioni non trattati

39. La raccolta dell'acqua (ambiente di emissione) in questo sistema e la successiva analisi delle sostanze lisciviate dai campioni di legno non trattati consentono di stimare il potenziale tasso di emissioni del conservante dal legno non trattato. La raccolta e l'analisi dell'ambiente di emissione dopo periodi crescenti di esposizione consentono di stimare l'evoluzione del tasso di emissione in funzione del tempo. Questa analisi costituisce una procedura di controllo per stabilire i livelli di fondo della sostanza in esame nel legno non trattato per accertarsi che il legname utilizzato per i campioni non sia stato precedentemente trattato con l'agente conservante.

DATI E RELAZIONE

Analisi chimiche

40. L'acqua raccolta è analizzata chimicamente e i risultati dell'analisi sono espressi in unità adeguate, ad esempio µg/l.

Relazione sui dati

41. Tutti i risultati sono registrati. In appendice si riporta un esempio di un modulo di registrazione consigliato per un gruppo di campioni di prova trattati e la tabella riassuntiva per calcolare i valori medi di emissione corrispondenti a ciascun intervallo di campionamento.
42. Il calcolo del flusso di emissioni giornaliere in mg/m²/giorno è effettuato dividendo la media delle tre misurazioni di tre repliche per il numero di giorni di immersione.

Relazione sulla prova

43. La relazione sulla prova deve contenere almeno le informazioni seguenti:
 - il nome del fornitore dell'agente conservante sottoposto a prova;
 - il nome o il codice unico e specifico del conservante sottoposto a prova;
 - il nome commerciale o corrente del o dei principi attivi con una descrizione generica dei coformulanti (ad esempio co-solvente, resina) e la percentuale m/m degli ingredienti;
 - la ritenzione o il carico pertinenti (in kg/m³ o l/m², rispettivamente) specificati per il legno impiegato a contatto con l'acqua;
 - la specie di legno utilizzato, con la relativa densità e il tasso di crescita in anelli per 10 mm;
 - il carico o la ritenzione dell'agente conservante testato e la formula utilizzata per calcolare la ritenzione, espressa in l/m² o kg/m³;
 - il metodo di applicazione del conservante, specificando il calendario di trattamento stabilito per un processo di penetrazione, e il metodo di applicazione qualora sia stato utilizzato un trattamento superficiale;
 - la data di applicazione del conservante, e una stima del tenore di umidità dei campioni di prova, espresso in percentuale;
 - le procedure di condizionamento utilizzate, precisandone il tipo, le condizioni e la durata;
 - il sigillante di testa utilizzato e il numero di applicazioni;
 - la notifica di qualsiasi trattamento successivo del legno, ad esempio, specifiche del fornitore, tipo, caratteristiche e tasso di applicazione di una pittura;
 - la data e l'ora di ogni episodio di immersione, la quantità di acqua utilizzata per l'immersione dei campioni in ciascun episodio e la quantità d'acqua assorbita dal legno durante l'immersione;
 - qualsiasi variazione rispetto al metodo descritto e altri fattori che possono aver avuto un impatto sui risultati.

BIBLIOGRAFIA

- (1) European Standard, EN 84 — 1997. Wood preservatives. Accelerated ageing of treated wood prior to biological testing. Leaching procedure.
- (2) European Standard, EN 113/A1 — 2004. Wood preservatives. Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes. Determination of the toxic values.
- (3) European Standard, EN 252 — 1989. Field test method for testing the relative protective effectiveness of a wood preservative in ground contact.
- (4) European Standard, EN 335 — Part 1: 2006. Durability of wood and wood-based products — Definition of use classes — Part1: General.

-
- (5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 — 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.
 - (6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II — 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.
-

Appendice 1

Formulario di registrazione per il metodo di prova**Stima delle emissioni nell'ambiente dal legno trattato con conservante: metodo di laboratorio per gli articoli in legno non rivestiti e in contatto con acqua dolce o acqua di mare**

Laboratorio di prova	
-----------------------------	--

Agente conservante del legno

Fornitore del conservante	
Nome o codice specifico e unico del conservante	
Nome commerciale o nome comune del conservante	
Co-formulanti	
Ritenzione per il legno utilizzato a contatto con l'acqua	

Applicazione

Metodo di applicazione	
Data di applicazione	
Formula utilizzata per calcolare la ritenzione	
Procedura di condizionamento	
Durata del condizionamento	
Agente sigillante alle estremità / numero di applicazioni	
Trattamento successivo	se pertinente

Campioni

Specie di legno	
Densità del legno	(minimo ... valore medio ... massimo)
Tasso di crescita (anelli per 10 mm)	(minimo ... valore medio ... massimo)
Tenore di umidità	

Assemblaggi di prova (*)	Ritenzione (es. kg/m ³)
con trattamento, "x"	Valore medio e deviazione standard o intervallo per 5 campioni
con trattamento, "y"	Valore medio e deviazione standard o intervallo per 5 campioni
con trattamento, "z"	Valore medio e deviazione standard o intervallo per 5 campioni
Non trattato	
Variazione dei parametri del metodo di prova	ad esempio, qualità dell'acqua, dimensione dei campioni ecc.

(*) x, y, z rappresentano le tre repliche di campioni.

Crono-logia	Cambio dell'acqua	Massa del campione		Assorbimento dell'acqua		Campione di acqua				
		Trattato (media)	Non trattato	Trattato (media)	Non trattato		Acqua utilizzata nelle prove	x	y	z
	Data	g	g	g	g	n.	pH	pH	pH	pH
inizio										
6h						1				
24h						2				
2 g						3				
4 g						4				
8 g						5				
15 g						6				
22 g						7				
29 g						8				

Stima delle emissioni nell'ambiente dal legno trattato con conservante: metodo di laboratorio per gli articoli in legno non rivestiti e in contatto con acqua dolce o acqua di mare

1.3.2016

IT

Gazzetta ufficiale dell'Unione europea

Crono-logia	Cambio dell'acqua	Risultati analitici														
		Campioni non trattati				Campioni trattati										
		Concentrazione del principio attivo nell'acqua mg/l	Quantità emessa mg/m ²	Tasso di emissione mg/m ² /d	Concentrazione del principio attivo nell'acqua				Quantità emessa				Tasso di emissione			
					x	y	z	Media	x	y	z	Media	x	y	z	Media
	Data	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m ² /d	mg/m ² /d	mg/m ² /d	mg/m ² /d							
6h																
24h																
2 g																
4 g																
8 g																
15 g																
22 g																
29 g																

Nota: Poiché i risultati dei campioni non trattati possono essere utilizzati per correggere i tassi di emissione dei campioni trattati, dovrebbero essere indicati per primi in quanto tutti i valori per i campioni trattati sono "valori corretti". Anche l'analisi iniziale dell'acqua può dar luogo ad una correzione.

*Appendice 2***Definizioni**

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela testata seguendo il presente metodo di prova.

C.46. BIOACCUMULO NEGLI OLIGOCHETI BENTONICI CHE VIVONO NEI SEDIMENTI

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 315 (2008). Gli animali freaticoli (endobentonici) che ingeriscono sedimenti possono essere esposti alle sostanze legate ai sedimenti (1). Tra le specie che ingeriscono sedimenti, gli oligocheti acquatici svolgono un ruolo importante alla base dei sistemi acquatici. Vivono nei sedimenti e costituiscono spesso la specie più abbondante in particolare negli habitat caratterizzati da condizioni ambientali sfavorevoli per altri animali. Attraverso la bioturbazione dei sedimenti e in quanto prede, questi animali possono incidere notevolmente sulla biodisponibilità di queste sostanze per altri organismi, come i pesci bentivori. Contrariamente agli organismi epibentonici, gli oligocheti acquatici freaticoli s'infossano nel sedimento, e ingeriscono particelle di sedimento al di sotto della superficie dello stesso. Questi organismi sono pertanto esposti a sostanze attraverso numerose vie di assorbimento, ivi compresi il contatto diretto, l'ingestione di particelle di sedimento contaminate, l'acqua interstiziale e l'acqua soprastante. Alcune specie di oligocheti bentonici attualmente impiegate in prove ecotossicologiche sono descritte nell'appendice 6.
2. I parametri che caratterizzano il bioaccumulo di una sostanza consistono in primis nel fattore di bioaccumulo (BAF), la costante di velocità di assorbimento dei sedimenti (k_a) e la costante di velocità di eliminazione (k_e). Le definizioni dettagliate di questi parametri figurano nell'appendice 1.
3. Per valutare in termini generali il potenziale di bioaccumulo delle sostanze e studiare il bioaccumulo delle sostanze che tendono a ripartirsi nei o sui sedimenti, è necessario un metodo di prova specifico per questo compartimento (1) (2) (3) (4).
4. Il presente metodo di prova è destinato a valutare il bioaccumulo di sostanze associate ai sedimenti nei vermi oligocheti freaticoli. La sostanza in esame è aggiunta al sedimento. Si utilizza un sedimento arricchito per simulare un sedimento contaminato.
5. Il presente metodo si basa su metodi di prova esistenti relativi alla tossicità e al bioaccumulo nei sedimenti (1) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Altri documenti utili sono: le discussioni e i risultati di un seminario internazionale (11) e il risultato di prove interlaboratorio internazionali (12).
6. Il metodo è adatto a sostanze organiche neutre stabili, che hanno tendenza ad associarsi a sedimenti. Questo metodo consente anche di misurare il bioaccumulo di composti organometallici stabili, associati a sedimenti (12). Non è adatto invece ai metalli e ad altri oligoelementi (11), se non si modifica il disegno sperimentale per quanto concerne i volumi di substrato e di acqua, ed eventualmente la dimensione dei campioni di tessuto.

PREREQUISITI E INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

7. Attualmente disponiamo solo di alcune "relazioni quantitative struttura-attività" (QSAR) consolidate in materia di processi di bioaccumulo (14). La relazione più comunemente usata è la correlazione tra il bioaccumulo e la bioconcentrazione di sostanze organiche stabili e la loro lipofilia (espressa come il logaritmo del coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua ($\log K_{ow}$); per la definizione vedi l'appendice 1), che è stata messa a punto per descrivere la ripartizione di una sostanza tra acqua e pesci. Questa relazione ha permesso di stabilire correlazioni per il comparto dei sedimenti (15) (16) (17) (18). La correlazione $\log K_{ow}$ - $\log BCF$, in quanto QSAR fondamentale, può essere utile per una prima stima preliminare del potenziale di bioaccumulo di sostanze associate ai sedimenti. Tuttavia, il fattore di bioaccumulo può essere influenzato dal tenore lipidico dell'organismo in esame e dal tenore di carbonio organico dei sedimenti. Pertanto, è possibile utilizzare anche il coefficiente di ripartizione carbonio-acqua (K_{oc}) come fattore indicativo determinante del bioaccumulo di sostanze organiche associate ai sedimenti.
8. Questo metodo di prova è applicabile:
 - alle sostanze organiche stabili i cui valori di K_{ow} sono compresi tra 3,0 e 6,0 (5) (19) e alle sostanze superlipofile il cui $\log K_{ow}$ è superiore a 6,0 (5);
 - alle sostanze appartenenti a classi di sostanze organiche note per il loro potenziale di bioaccumulo negli organismi viventi, ad esempio le sostanze fortemente adsorbenti o tensioattive (ad es. con K_{oc} elevato).

9. Prima dell'inizio dello studio occorre disporre di determinate informazioni sulla sostanza in esame, tra cui: precauzioni di sicurezza, condizioni di conservazione adeguate, stabilità e metodi di analisi. Al riferimento 20 e 21 sono forniti orientamenti per le prove relative a sostanze le cui proprietà fisiochimiche ostacolano le prove in questione. Prima di eseguire una prova di bioaccumulo con oligocheti acquatici, occorre disporre delle informazioni sulla sostanza di prova elencate qui di seguito:

- nome comune, nome chimico (di preferenza nome IUPAC), formula strutturale, numero CAS, purezza;
- solubilità in acqua [metodo di prova A.6 (22)];
- coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua, K_{ow} [metodi di prova A.8, A.24 (22)];
- coefficiente di ripartizione sedimento-acqua, espresso come K_d o K_{oc} [metodo di prova C.19 (22)];
- idrolisi [metodo di prova C.7 (22)];
- fotolisi in acqua (23);
- pressione di vapore [metodo di prova A.4 (22)];
- pronta biodegradabilità [metodi di prova C.4 e C.29 (22)];
- tensione superficiale [metodo di prova A.5 (22)];
- concentrazione micellare critica (24).

Ove disponibili sono utili anche le informazioni seguenti:

- biodegradazione nell'ambiente acquatico [metodi di prova C.24 e C.25 (22)];
 - costante di Henry.
10. Se le sostanze in esame sono radiomarcate possono agevolare l'analisi dei campioni di acqua e di sedimento e dei campioni biologici, e in tal modo contribuire a stabilire se occorre procedere all'identificazione e alla quantificazione dei prodotti di degradazione. Il metodo qui descritto è stato convalidato in una prova interlaboratorio internazionale (12) per sostanze marcate con ^{14}C . Se si misurano i residui radioattivi totali, il fattore di bioaccumulo (BAF) si basa sulla sostanza madre, ma anche sugli eventuali prodotti di degradazione considerati. È anche possibile combinare uno studio sul metabolismo con uno studio di bioaccumulo mediante l'analisi e la quantificazione della percentuale di sostanza madre e dei suoi prodotti di degradazione nei campioni prelevati alla fine della fase di assorbimento o nel livello di picco del bioaccumulo. In ogni caso, si raccomanda di fondare il calcolo del BAF sulla concentrazione della sostanza madre negli organismi e non solo sui residui radioattivi totali.
11. Oltre alle proprietà della sostanza in esame, un'altra informazione necessaria è la tossicità per la specie di oligocheti da utilizzare nella prova, quali la concentrazione letale media (CL₅₀) per il periodo necessario per la fase di assorbimento, al fine di garantire che le concentrazioni di esposizione selezionate siano di gran lunga inferiori ai livelli tossici. Si devono privilegiare, se disponibili, i valori di tossicità ricavati da studi a lungo termine sugli endpoint subletali (EC₅₀). Se tali dati non sono disponibili, una prova di tossicità acuta in condizioni identiche a quelle della prova di bioaccumulo, o dati tossicologici concernenti specie alternative possono fornire informazioni utili.
12. È necessario disporre di un metodo analitico appropriato, di accuratezza, precisione e sensibilità note per la quantificazione della sostanza in esame nelle soluzioni di prova, nel sedimento e nel materiale biologico, oltre a dettagli relativi alla preparazione e alla conservazione del campione e alle schede dati sulla sicurezza. Devono essere noti anche i limiti di rivelabilità analitica della sostanza in esame nell'acqua, nel sedimento e nei tessuti dell'animale. Quando per la prova si utilizza una sostanza radiomarcata è necessario conoscere la radioattività specifica (ad es. Bq mol⁻¹), la posizione dell'atomo radiomarcato e la percentuale di radioattività associata alle impurità. La radioattività specifica della sostanza in esame dovrebbe essere il più elevata possibile per poter individuare nella prova le concentrazioni più basse possibile (11).
13. Occorre disporre di informazioni sulle caratteristiche del sedimento utilizzato (ad esempio origine o componenti del sedimento, pH e concentrazione di ammoniaca dell'acqua interstiziale (sedimenti naturali), contenuto di carbonio organico (TOC), distribuzione granulometrica (percentuale di sabbia, limo e argilla e percentuale di peso a secco) (6).

PRINCIPIO DELLA PROVA

14. La prova consta di due fasi: la fase di assorbimento (esposizione) e la fase di eliminazione (post-esposizione). Durante la fase di assorbimento, i vermi sono esposti al sedimento addizionato con la sostanza in esame, immerso in acqua ricostituita e adeguatamente equilibrato (11). Gruppi di animali di controllo sono tenuti in condizioni identiche ma senza la sostanza in esame.
15. Per la fase di eliminazione, i vermi sono trasferiti in un sistema sedimento-acqua privo della sostanza in esame. Per ottenere informazioni sulla velocità alla quale la sostanza in esame è escreta dagli organismi di prova (19) (25) è necessaria una fase di eliminazione. Questa fase è sempre necessaria a meno che l'assorbimento della sostanza in esame nel corso della fase di esposizione sia insignificante (ad es. nessuna differenza statistica tra la concentrazione della sostanza in esame negli organismi sottoposti alla prova e la concentrazione negli organismi di controllo). Se, nella fase di assorbimento, non è stato raggiunto uno stato stazionario la determinazione dei parametri cinetici — fattore di bioaccumulo cinetico (BAF_k), costanti di velocità di assorbimento ed eliminazione — può essere effettuata sulla base dei risultati della fase di eliminazione. La variazione della concentrazione della sostanza in esame nei/sui vermi è monitorata per l'intera durata delle due fasi della prova.
16. Nel corso della fase di assorbimento, si effettuano misurazioni fino a quando il BAF non raggiunge un plateau o uno stato stazionario. Salvo indicazioni contrarie, la durata della fase di assorbimento dovrebbe essere di 28 giorni. Nella pratica si è visto che per varie sostanze organiche neutre stabili basta una fase di assorbimento di 12-14 giorni per raggiungere uno stato stazionario (6) (8) (9).
17. Tuttavia, se lo stato stazionario non è raggiunto entro 28 giorni, la fase di eliminazione è avviata con il trasferimento degli oligocheti esposti in recipienti contenenti lo stesso mezzo senza la sostanza in esame. La fase di eliminazione si considera terminata quando si raggiunge un livello di concentrazione corrispondente al 10 % della concentrazione misurata negli animali il giorno 28 della fase di assorbimento, o dopo un periodo massimo di 10 giorni. Il livello di residui negli organismi alla fine della fase di eliminazione è considerato come un ulteriore endpoint, ad esempio come "residui non eliminati" (NER). Il fattore di bioaccumulo (BAF_{ss}) è calcolato di preferenza sia come il rapporto tra la concentrazione negli animali (Ca) e nel sedimento (Cs) in uno stato stazionario apparente, sia come fattore di bioaccumulo cinetico $BAFK$, ossia come il rapporto tra la costante di velocità d'assorbimento dal sedimento (ks) e la costante di velocità di eliminazione (ke) presupponendo una cinetica di prim'ordine. Se entro 28 giorni non si raggiunge uno stato stazionario, occorre calcolare il $BAFK$ dalle costanti di velocità di assorbimento e di eliminazione. Per il calcolo, cfr. appendice 2. Se la cinetica non è di prim'ordine, occorrerà utilizzare modelli più complessi (appendice 2 e riferimento (25)).
18. Se entro 28 giorni non viene raggiunto uno stato stazionario, la fase di assorbimento può eventualmente essere prorogata sottponendo gruppi di vermi esposti — se disponibili — ad ulteriori misurazioni fino a quando non venga raggiunto lo stato stazionario; parallelamente, la fase di eliminazione dovrebbe essere comunque avviata il giorno 28 della fase di assorbimento.
19. La costante di velocità di assorbimento, la costante di velocità di eliminazione (o le costanti, se si utilizzano modelli più complessi), il fattore di bioaccumulo cinetico (BAF_k) e, se possibile, i limiti di confidenza di ciascuno di questi parametri sono calcolati a partire dalle equazioni dei modelli informatici corrispondenti (per i modelli, cfr. appendice 2). L'adeguatezza di un modello può essere desunta dal coefficiente di correlazione o dal coefficiente di determinazione (i coefficienti vicini a 1 indicano una buona adeguatezza).
20. Per ridurre la variabilità dei risultati della prova per le sostanze organiche ad elevata lipofilia, i fattori di bioaccumulo devono essere espressi anche in relazione al contenuto lipidico degli organismi di prova e al contenuto di carbonio organico (TOC) nel sedimento (fattore di accumulo biota-sedimento o BSAF in kg di sedimento TOC kg^{-1} di contenuto lipidico dei vermi). Questo approccio si basa su esperimenti e correlazioni teoriche per il compartimento acquatico dove — per alcune classi chimiche — esiste una chiara relazione tra il potenziale di bioaccumulo di una sostanza e la sua lipofilia, che è stata chiaramente stabilita utilizzando i pesci come organismi modello (14) (25) (27). Esiste altresì una relazione tra il contenuto lipidico dei pesci in esame e il bioaccumulo osservato di tali sostanze. Per gli organismi bentonici, sono state riscontrate correlazioni analoghe (15) (16) (17) (18). Se si dispone di una quantità sufficiente di tessuto di verme, si può determinare il tenore lipidico degli animali in esame sullo stesso materiale biologico utilizzato per determinare la concentrazione della sostanza in esame. Tuttavia è più facile utilizzare animali di controllo acclimatati almeno all'inizio o — preferibilmente — alla fine della fase di assorbimento per misurare il contenuto lipidico che può essere successivamente utilizzato per normalizzare i valori di BAF.

VALIDITÀ DELLA PROVA

21. Perché una prova sia valida devono realizzarsi le seguenti condizioni:
 - La mortalità cumulativa degli animali (di controllo e trattati) fino al termine della prova non deve superare il 20 % del numero iniziale.
 - Inoltre, si dovrebbe dimostrare che gli animali s'infossano nel sedimento per garantire la massima esposizione. Per maggior dettagli, v. paragrafo 28.

DESCRIZIONE DEL METODO

Specie in esame

22. Per la prova possono essere utilizzate varie specie di oligocheti acquatici. Le specie più utilizzate sono elencate nell'appendice 6.
23. Le prove di tossicità (96 h, solo in acqua) dovrebbero essere eseguite a intervalli regolari (ad esempio ogni mese) con un tossico di riferimento come il cloruro di potassio (KCl) o il sulfato di rame (CuSO_4) (1) per comprovare lo stato di salute degli animali in esame (1) (6). Se le prove di tossicità di riferimento non sono condotte a intervalli periodici, il lotto di organismi destinato ad essere utilizzato in una prova di bioaccumulo nei sedimenti dovrebbe essere controllato utilizzando un tossico di riferimento. La misurazione del contenuto lipidico potrebbe anche fornire informazioni utili sulle condizioni degli animali.

Allevamento degli organismi di prova

24. Al fine di disporre di un numero sufficiente di vermi per eseguire le prove di bioaccumulo, potrebbe essere necessario allestire nel laboratorio un allevamento permanente della specie in questione. I metodi di allevamento in laboratorio per le specie di prova selezionate sono riassunti nell'appendice 6. Per i dettagli v. i riferimenti (8) (9) (10) (18) (28) (29) (30) (31) (32).

Apparecchiatura

25. Per tutte le parti dell'apparecchiatura, evitare accuratamente l'uso di materiali che possono dissolversi, assorbire sostanze di prova o lisciviare altre sostanze o avere un effetto dannoso sugli animali testati. Si possono usare normali contenitori rettangolari o cilindrici di materiale chimicamente inerte e di capacità adeguata al tasso di carico, ad es. al numero degli animali in esame. Occorre evitare l'utilizzo di tubi di plastica flessibili per somministrare acqua o aria. Per le apparecchiature destinate ad entrare in contatto con il mezzo di prova si può usare politetrafluoroetilene, acciaio inossidabile e/o vetro. Per le sostanze con elevati coefficienti di adsorbimento, come i piretroidi sintetici, può essere necessario il vetro silanizzato. In tal caso le apparecchiature non possono essere riutilizzate (5). Per le sostanze in esame radiomarcate e le sostanze volatili si avrà cura di evitare l'evaporazione e la conseguente fuoriuscita della sostanza in esame. Si dovrebbero utilizzare dei dispositivi di intrappolamento (ad esempio bottiglie di lavaggio per gas in vetro) contenenti assorbenti adatti per catturare eventuali residui che evaporano dai contenitori di prova (11).

Acqua

26. L'acqua sovrastante deve essere di una qualità che permetta la sopravvivenza delle specie in esame per la durata del periodo di acclimatazione e dei periodi di prova senza che gli animali manifestino aspetti o comportamenti anomali. Sia per le prove che per gli allevamenti di laboratorio si raccomanda di utilizzare, come acqua sovrastante, un'acqua ricostituita conformemente al metodo di prova C.1 (25). È stato dimostrato che molte specie utilizzate nelle prove possono sopravvivere, crescere e riprodursi in questa acqua (8), che garantisce anche la massima standardizzazione delle condizioni di prova e di allevamento. L'acqua dovrebbe essere caratterizzata perlomeno in termini di pH, conduttività e durezza. La ricerca di microinquinanti nell'acqua prima del suo utilizzo, può fornire informazioni utili.
27. L'acqua dovrebbe essere di qualità costante per tutta la durata di una prova. Il pH dell'acqua sovrastante deve essere compreso tra 6 e 9. All'inizio della prova la durezza totale dovrebbe essere compresa tra 90 e 400 mg di CaCO_3 per litro (7). L'intervallo di variazione del pH e della durezza nell'acqua ricostituita in questione è indicato nel metodo di prova C.1 (25). Se però si sospetta che vi sia un'interazione tra gli ioni che determinano la durezza e la sostanza in esame, occorre utilizzare un'acqua meno dura. L'appendice 4 riassume criteri aggiuntivi per un'acqua di diluizione adeguata conformemente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 210 (34).

Sedimento

28. Il sedimento deve essere di una qualità tale da permettere la sopravvivenza e, preferibilmente, la riproduzione degli organismi di prova nel corso dei periodi di acclimatazione e di prova senza che essi manifestino un aspetto o un comportamento anomali. I vermi dovrebbero infossarsi nel sedimento. Il comportamento fossorio può incidere sull'esposizione e dunque sul fattore di bioaccumulo (BAF). Pertanto, se la torbidità dell'acqua sovrastante lo consente, occorre osservare la tendenza ad evitare i sedimenti o il comportamento fossorio degli organismi in esame. I vermi (di controllo e trattati) dovrebbero infossarsi nel sedimento entro 24 ore dalla loro sistemazione nei recipienti di prova. Se gli animali non manifestano affatto un comportamento fossorio o manifestano la tendenza ad evitare il sedimento (ad esempio più del 20 % degli animali non si è infossato per oltre la metà della fase di assorbimento) la causa va ricercata nelle condizioni sperimentali, che potrebbero essere inadeguate, nello stato di salute degli organismi di prova o nella concentrazione della sostanza in esame che potrebbe incoraggiare questo comportamento. In tal caso la prova deve essere interrotta e ripetuta in condizioni migliori. Si possono ottenere informazioni supplementari sull'ingestione del sedimento con i metodi descritti in (35) (36), che riguardano l'ingestione di sedimenti o la selezione del particolato da parte degli organismi di prova. Nell'interpretazione dei risultati della prova in relazione alle vie di esposizione, se rilevabile, occorre registrare e tenere conto della presenza o l'assenza di pellet (grumi) fecali sulla superficie del sedimento, che indicano l'ingestione del sedimento da parte dei vermi.
29. Si raccomanda l'utilizzo di un sedimento artificiale basato sul suolo artificiale descritto nel metodo di prova C.8 (40) in entrambi i test e per l'allevamento dei vermi in laboratorio (appendice 5), in quanto i sedimenti naturali di qualità adeguata potrebbero non essere sempre disponibili nel corso dell'anno. Inoltre gli organismi indigeni e l'eventuale presenza di microinquinanti nei sedimenti naturali possono incidere sulla prova. Varie specie in esame sono in grado di sopravvivere, crescere e riprodursi nel sedimento artificiale (8).
30. Il sedimento artificiale deve essere caratterizzato, almeno in termini di origine dei componenti, distribuzione granulometrica (percentuale di sabbia, limo e argilla), contenuto di carbonio organico (TOC), tenore di acqua e pH. La misurazione del potenziale di ossido-riduzione è facoltativa. È tuttavia possibile impiegare come sedimenti di prova e/o di allevamento anche sedimenti naturali provenienti da siti non inquinati (1). I sedimenti naturali dovrebbero essere caratterizzati almeno in termini di: origine (sito di prelievo), pH e ammoniaca nell'acqua interstiziale, contenuto di carbonio organico (TOC), distribuzione granulometrica (percentuale di sabbia, limo e argilla) e tenore di umidità in percentuale (6). Se si prevede la formazione di ammoniaca, prima di aggiungere la sostanza in esame nel sedimento naturale, si raccomanda di mantenerlo per sette giorni alle stesse condizioni in cui verrà realizzata la prova. Al termine di questo periodo di condizionamento, l'acqua sovrastante dovrebbe essere rimossa ed eliminata. La ricerca di microinquinanti nei sedimenti o nei loro componenti, prima dell'utilizzo, fornisce informazioni utili.

Preparazione

31. La manipolazione di sedimenti naturali prima del loro utilizzo in laboratorio è descritta in (1) (6) (44). La preparazione del sedimento artificiale è descritta nell'appendice 5.

Stoccaggio

32. La durata di stoccaggio dei sedimenti naturali in laboratorio dovrebbe essere il più breve possibile. L'Agenzia di protezione ambientale statunitense (US EPA) (6) raccomanda un periodo massimo di conservazione di 8 settimane a 4 ± 2 °C al buio. Non dovrebbero esserci spazi vuoti sulla superficie del sedimento nel recipiente di stoccaggio. L'appendice 5 contiene delle raccomandazioni concernenti lo stoccaggio di sedimenti artificiali.

Applicazione della sostanza in esame

33. La sostanza in esame è aggiunta nel sedimento. Il processo di addizione consiste nel rivestire uno o più componenti del sedimento con la sostanza in esame. Ad esempio, si può impregnare la sabbia di quarzo, o parte di essa (ad es. 10 g. di quarzo per recipiente di prova) con una soluzione della sostanza in esame in un solvente adatto, che si lascia poi evaporare lentamente fino ad essiccamiento. La frazione rivestita può così essere mescolata al sedimento umido. Nel preparare il sedimento, occorre tener conto della quantità di sabbia contenuta nella miscela di sostanza in esame e sabbia (il sedimento, quindi, va preparato con meno sabbia) (6).

34. Quando si utilizza un sedimento naturale, la sostanza in esame può essere aggiunta arricchendo una porzione di sedimento essiccato come descritto in precedenza per il sedimento artificiale, oppure mescolandola al sedimento umido, con successiva fase di evaporazione se si utilizza un agente solubilizzante. I solventi che si possono addizionare al sedimento umido sono l'etanolo, il metanolo, l'etere monometilico del glicol etilenico, l'etere dimetilico del glicol etilenico, il dimetilformammide e il glicol trietilenico (5) (34). La tossicità e la volatilità del solvente, e la solubilità della sostanza in esame nel solvente prescelto dovrebbero costituire i criteri principali per la scelta dell'agente solubilizzante. Ulteriori orientamenti sulle procedure di addizione sono contenute in Environment Canada (1995) (41). Occorre accertarsi che la sostanza in esame aggiunta al sedimento sia perfettamente e omogeneamente distribuita al suo interno. Dei sottocampioni di repliche del sedimento arricchito dovrebbero essere analizzati al fine di verificare le concentrazioni della sostanza in esame e stabilire il grado di omogeneità della distribuzione della sostanza in esame.
35. Una volta che il sedimento addizionato e l'acqua sovrastante sono stati preparati, è preferibile lasciare che la sostanza in esame si ripartisca tra il sedimento e la fase acquosa; di preferenza, ciò dovrebbe avvenire alle stesse condizioni di temperatura e aerazione utilizzate nella prova. Il tempo di equilibratura può durare alcune ore, dei giorni o, in rari casi, fino a 4 o 5 settimane, a seconda del sedimento e della sostanza chimica (28) (42). In questa prova, non si mira a raggiungere l'equilibrio, ma si raccomanda un periodo di equilibratura da 48 ore a 7 giorni. In funzione della finalità dello studio, ad esempio se si tratta di simulare condizioni ambientali, può essere necessario equilibrare o invecchiare il sedimento per un periodo più lungo (11).

ESECUZIONE DELLA PROVA

Prova preliminare

36. Può essere utile condurre un esperimento preliminare allo scopo di ottimizzare le condizioni sperimentalistiche della prova definitiva, per esempio la scelta delle concentrazioni della sostanza in esame e la durata delle fasi di assorbimento e di eliminazione. Nel corso di una prova preliminare è opportuno osservare e prendere nota del comportamento dei vermi, ad esempio la tendenza ad evitare il sedimento (i vermi si allontano dal sedimento) che può essere causata dalla sostanza in esame e/o dal sedimento stesso. La tendenza ad evitare il sedimento può essere utilizzata come un parametro subletale in una prova preliminare per stimare le concentrazioni della sostanza in esame da utilizzare in una prova di bioaccumulo.

Condizioni di esposizione

Durata della fase di assorbimento

37. Gli organismi sperimentalistici sono esposti alla sostanza in esame durante la fase di assorbimento. Il primo campione deve essere prelevato da 4 a 24 ore dopo l'inizio della fase di assorbimento. La fase di assorbimento deve durare 28 giorni (1) (6) (11), salvo si possa dimostrare che l'equilibrio è stato raggiunto prima. Lo stato stazionario è raggiunto quando: (i) un tracciato dei fattori di bioaccumulo per ciascun periodo di campionamento in funzione del tempo è parallelo all'asse del tempo; (ii) tre analisi successive del BAF effettuate su campioni prelevati ad intervalli di almeno due giorni non differiscono di oltre il 20 % l'una dall'altra; e (iii) non vi sono differenze significative tra i tre periodi di campionamento (sulla base di raffronti statistici, ad esempio analisi della varianza e analisi di regressione). Se lo stato stazionario non viene raggiunto entro 28 giorni, la fase di assorbimento può essere conclusa prima di avviare la fase di eliminazione e il BAF_k può essere calcolato a partire dalle costanti di velocità di assorbimento e di eliminazione (cfr. anche i paragrafi da 16 a 18).

Durata della fase di eliminazione

38. Il primo campione dovrebbe essere prelevato tra 4 e 24 ore dopo l'inizio della fase di eliminazione, in quanto i residui di tessuto possono modificarsi rapidamente durante il periodo iniziale. Si raccomanda di porre fine alla fase di eliminazione quando la concentrazione della sostanza in esame è inferiore al 10 % della concentrazione in stato stazionario o dopo al massimo 10 giorni. Il livello di residui negli animali alla fine della fase di eliminazione costituisce un endpoint secondario. Il periodo può tuttavia dipendere dal periodo durante il quale la concentrazione della sostanza in esame nei vermi rimane al di sopra del limite di rivelabilità analitica.

Organismi in esame

Numero di animali testati

39. Il numero di vermi per campione deve costituire una massa di tessuto tale da garantire che la massa della sostanza in esame (per campione), all'inizio della fase di assorbimento e alla fine della fase di eliminazione, rispettivamente, sia notevolmente superiore al limite di rivelabilità per la sostanza in esame nel materiale biologico. Nelle fasi di assorbimento e di eliminazione menzionate la concentrazione negli animali in esame è in genere relativamente bassa (6) (8) (18). Poiché il peso individuale di molte specie di oligocheti acquatici è molto basso (5-10 mg di peso umido per individuo per il *Lumbriculus variegatus* e il *Tubifex tubifex*), per la pesatura e l'analisi della sostanza in esame si possono considerare insieme i vermi di una determinata replica. Per le specie sperimentali di peso individuale maggiore (ad esempio *Branchiura sowerbyi*) si possono utilizzare repliche costituite di un solo individuo, ma in tali casi il numero di repliche deve essere portato a cinque per punto di campionamento (11). Si deve tuttavia osservare che *B. sowerbyi* non è stata inclusa nella prova interlaboratorio (12), e pertanto non rientra tra le specie più indicate per il presente metodo.
40. Dovrebbero essere utilizzati animali di dimensioni analoghe (per *L. variegatus* cfr. l'appendice 6), provenienti dalla stessa fonte e si dovrebbe trattare di adulti o animali di grandi dimensioni della stessa classe di età (cfr. l'appendice 6). Il peso e l'età dell'animale possono avere un effetto significativo sui valori del BAF (a causa, per esempio, del diverso contenuto lipidico e/o della presenza di uova); occorre prendere nota con attenzione di questi parametri. Per misurare il peso secco e umido medio occorre pesare un sottocampione di vermi prima dell'inizio della prova.
41. Per *Tubifex tubifex* e *Lumbriculus variegatus*, probabilmente si verificherà una riproduzione nel corso della prova. Si dovrebbe prendere nota e tener conto ai fini dell'interpretazione dei risultati dell'eventuale assenza di riproduzione nel corso di una prova di bioaccumulo.

Carico

42. Per minimizzare la riduzione della concentrazione della sostanza in esame nel sedimento nel corso della fase di assorbimento e per evitare una riduzione della concentrazione dell'ossigeno disciolto si dovrebbero utilizzare rapporti elevati sedimento/verme e acqua/verme. I tassi di carico scelti dovrebbero inoltre corrispondere alle densità di popolazione osservate in natura per la specie in questione (43). Per esempio, per *Tubifex tubifex* si raccomanda un tasso di carico da 1 a 4 mg di tessuto di vermi (peso umido) per grammo di sedimento umido (8) (11). Per *L. variegatus*, i riferimenti (1) e (6) raccomandano un tasso di carico di ≤1 g di peso secco di tessuto per 50 g di carbonio organico del sedimento.
43. Gli animali da utilizzare nella prova sono prelevati dall'allevamento mediante setacciatura del sedimento di allevamento. Gli animali (adulti o vermi di grandi dimensioni senza segni di frammentazione recente) sono trasferiti su piastre di vetro (ad esempio, capsula di Petri) contenenti acqua pulita. Se le condizioni sperimentali sono diverse dalle condizioni di allevamento, una fase di acclimatazione di 24 ore dovrebbe essere sufficiente. Prima della pesatura, occorre eliminare dagli animali l'acqua in eccesso, ad esempio ponendo i vermi con delicatezza su un fazzoletto di carta preumidificato. Si consiglia di utilizzare carta assorbente per asciugare gli animali in quanto ciò può provocare stress o danni. Brunson et al. (1998) raccomandano l'uso di animali non asciugati per tamponamento pari a circa 1,33 volte la biomassa necessaria. Il 33 % supplementare corrisponde alla differenza tra animali asciugati per tamponamento e quelli non asciugati con questa modalità (28).
44. All'inizio della fase di assorbimento (giorno 0 della prova), gli organismi sperimentali sono prelevati dalla camera di acclimatazione e distribuiti in maniera casuale nei recipienti (ad esempio, capsule di Petri) contenenti acqua ricostituita, aggiungendo gruppi di due vermi in ciascun recipiente, fino a quando ogni recipiente contiene dieci animali. Ciascuno di questi gruppi di vermi viene poi trasferito in modo casuale in recipienti di prova separati, utilizzando, ad esempio, pinze in acciaio dolce. I recipienti di prova sono successivamente incubati in condizioni di prova.

Alimentazione

45. Dato il suo contenuto nutritivo limitato, il sedimento artificiale dovrebbe essere integrato con una fonte alimentare. Per non sottovalutare l'esposizione degli organismi sperimentali, ad esempio somministrando selettivamente alimenti non contaminati, gli alimenti necessari per la riproduzione e la crescita degli organismi di prova dovrebbero essere addizionati al sedimento, in un'unica soluzione, prima o durante l'applicazione della sostanza in esame (vedi appendice 5).

Rapporto sedimento-acqua

46. Il rapporto sedimento/acqua raccomandato è di 1:4 (45). Questo rapporto è ritenuto idoneo a mantenere le concentrazioni di ossigeno a livelli adeguati e evitare l'accumularsi di ammoniaca nell'acqua sovrastante. Il tenore di ossigeno nell'acqua sovrastante dovrebbe essere mantenuto a $\geq 40\%$ della saturazione. L'acqua sovrastante dei recipienti di prova dovrebbe essere delicatamente aerata (ad esempio da 2 a 4 bolle al secondo) per mezzo di una pipetta Pasteur collocata a circa 2 cm sopra la superficie del sedimento in modo da ridurre al minimo la perturbazione del sedimento.

Illuminazione e temperatura

47. Il fotoperiodo dell'allevamento e della prova è di 16 ore (1) (6). L'intensità della luce nella zona della prova va mantenuta a circa 500 - 1 000 lux. La temperatura dovrebbe essere di 20 °C (con uno scarto massimo di $\pm 2^\circ\text{C}$) per tutta la durata della prova.

Concentrazioni di prova

48. Una concentrazione di prova (quanto più bassa possibile) è usata per determinare la cinetica di assorbimento, ma si può utilizzare anche una seconda concentrazione (superiore) (cfr. ad esempio (46)). In tal caso, i campioni sono prelevati e analizzati allo stato stazionario o dopo 28 giorni per confermare il BAF misurato alla concentrazione più bassa (11). La concentrazione più elevata dovrebbe essere scelta in modo da escludere effetti negativi (ad esempio scegliendo una concentrazione di circa l'1 % inferiore alla concentrazione con effetti cronici più bassa conosciuta EC_x, sulla base di studi pertinenti di tossicità cronica). La concentrazione di prova più bassa dovrebbe essere nettamente superiore al limite di rivelabilità nel sedimento e nei campioni biologici del metodo d'analisi utilizzato. Se la concentrazione efficace della sostanza in esame è vicina al limite di rivelabilità analitico, si raccomanda di utilizzare una sostanza di prova radiomarcata con radioattività specifica elevata.

Repliche trattate e di controllo

49. Per le misurazioni cinematiche il numero minimo di repliche esposte è tre per punto di campionamento (11) per l'intera durata delle fasi di assorbimento e di eliminazione. Per ottenere campionamenti supplementari di carattere facoltativo, si devono utilizzare repliche aggiuntive. Per la fase di eliminazione, viene preparato un numero adeguato di repliche con sedimento e acqua sovrastante non addizionati, in modo che, alla fine della fase di assorbimento, i vermi trattati possano essere trasferiti dai recipienti di esposizione a recipienti non trattati. Il numero totale di repliche esposte dovrebbe essere sufficiente sia per la fase di assorbimento sia per la fase di eliminazione.
50. In alternativa, gli animali destinati al campionamento nella fase di eliminazione possono essere esposti in un grande contenitore contenente sedimento addizionato proveniente dallo stesso lotto di quello utilizzato per lo studio della cinematica di assorbimento. Occorre dimostrare che le condizioni di prova (ad esempio, profondità del sedimento, rapporto sedimento-acqua, carico, temperatura, qualità dell'acqua) sono paragonabili alle condizioni delle repliche utilizzate per la fase di assorbimento. Al termine della fase di assorbimento, i campioni di acqua, sedimento e vermi dovrebbero essere prelevati da questo contenitore per essere analizzati, e un numero sufficiente di vermi di grandi dimensioni, che non presentano segni di frammentazione recente, dovrebbero essere prelevati con cura e trasferiti nelle repliche preparate per la fase di eliminazione (ad esempio dieci organismi per replica).
51. Se come solvente si utilizza solo acqua, per l'analisi biologica e dei valori di fondo è opportuno prevedere almeno 9 repliche di controllo negativo (almeno 3 campioni all'inizio, 3 alla fine dell'assorbimento e 3 alle fine dell'eliminazione). Se per l'applicazione della sostanza in esame si utilizza un agente di solubilizzazione, occorre allestire repliche di controllo con solvente (almeno 3 repliche all'inizio, 3 alla fine della fase di assorbimento e 3 alla fine della fase di eliminazione). In tal caso si dovrebbero allestire almeno 4 repliche di controllo negativo (senza solvente) per il campionamento al termine della fase di assorbimento. Queste repliche possono essere confrontate biologicamente con quelle di controllo con solvente per ottenere informazioni sull'eventuale impatto del solvente sugli organismi di prova. I dettagli figurano all'appendice 3.

Frequenza delle misurazioni della qualità dell'acqua

52. Durante le fasi di assorbimento e di eliminazione, per l'acqua sovrastante si dovrebbero quanto meno misurare i parametri di qualità dell'acqua seguenti:

Temperatura	in un recipiente corrispondente a ciascun livello di esposizione per data di campionamento, e in un recipiente di controllo una volta a settimana all'inizio e alla fine delle fasi di assorbimento e di eliminazione; può anche essere registrata, di continuo o a intervalli di un'ora, la temperatura nell'ambiente circostante (aria ambiente o bagno d'acqua) o in un recipiente di prova rappresentativo;
Contenuto di ossigeno disciolto	in un recipiente corrispondente a ciascun livello di esposizione e in un recipiente di controllo per data di campionamento; espresso in mg/l e in % del valore di saturazione dell'aria (ASV);
Alimentazione di aria	controllata almeno una volta al giorno (giorni feriali) e adattata se necessario;
pH	in un recipiente corrispondente a ciascun livello di esposizione per data di campionamento e in un recipiente di controllo una volta a settimana e all'inizio e alla fine delle fasi di assorbimento e di eliminazione;
Durezza totale dell'acqua	almeno in un recipiente esposto e in un recipiente di prova di controllo all'inizio e alla fine delle fasi di assorbimento e di eliminazione, espressa in mg di CaCO ₃ per litro;
Tenore totale di ammoniacica	almeno in un recipiente esposto e in un recipiente di prova di controllo all'inizio e alla fine delle fasi di assorbimento e di eliminazione; espresso in mg di NH ₄ ⁺ , NH ₃ o azoto ammoniacale totale per litro.

Campionamento e analisi dei vermi, del sedimento e dell'acqua

Calendario del campionamento

53. L'appendice 3 contiene qualche esempio di programma di campionamento con fase di assorbimento di 28 giorni e fase di eliminazione di 10 giorni.
54. Un campione di acqua e di sedimento è prelevato dai contenitori di prova per determinare la concentrazione della sostanza in esame prima di introdurre gli animali, e durante le fasi di assorbimento e di eliminazione. Durante la prova si determinano le concentrazioni della sostanza in esame negli animali, nel sedimento e nell'acqua al fine di monitorare la distribuzione della sostanza in esame nei vari compartimenti del sistema di prova.
55. Nel corso delle fasi di assorbimento e di eliminazione sono prelevati campioni di vermi, sedimento e acqua almeno a 6 riprese.
56. Occorre continuare il campionamento fino a quando non si arriva ad una fase di plateau (stato stazionario) (cfr. l'appendice 1) o per 28 giorni. Se il plateau non viene raggiunto entro 28 giorni, iniziare la fase di eliminazione. All'avvio della fase di eliminazione, trasferire i vermi selezionati nei contenitori delle repliche contenenti sedimento e acqua non esposti (cfr. anche i paragrafi 17 e 18).

Campionamento e preparazione del campione

57. I campioni di acqua sono ottenuti per decantazione, sifonaggio o "pipettatura" di un volume sufficiente per misurare la quantità della sostanza in esame nel campione.
58. L'acqua sovrastante rimanente è attentamente decantata o sifonata dal o dai contenitori di prova. I campioni di sedimento devono essere prelevati con delicatezza, in modo da causare il minor disturbo possibile ai vermi.
59. Prelevare tutti gli animali dalla replica di prova al momento del campionamento, per esempio mettendo in sospensione il sedimento con l'acqua sovrastante, spargendo il contenuto di ogni replica su un vassoio poco profondo e prelevando i vermi con pinze in acciaio dolce. Sciacquarli rapidamente con acqua in un recipiente in vetro o acciaio poco profondo. Eliminare l'acqua in eccesso. Trasferire i vermi delicatamente in un recipiente tarato e pesarli. Sacrificare gli animali mediante congelamento (es.: ≤-18 °C). Occorre prendere nota della presenza di bozzoli e di animali giovani e del loro numero.

60. In generale, gli animali dovrebbero essere pesati e sacrificati immediatamente dopo il campionamento, senza fase di evacuazione intestinale, per ottenere un BAF prudente che comprenda il contenuto intestinale contaminato e evitare le perdite di residui corporei durante un'eventuale fase di evacuazione intestinale unicamente in acqua (8). Le sostanze con $\log K_{ow}$ superiore a 5 di norma non vengono eliminate in maniera significativa durante un'evacuazione intestinale unicamente in acqua, mentre le sostanze con $\log K_{ow}$ inferiore a 4 possono essere eliminate in quantità significative (47).
61. Durante la fase di eliminazione, i vermi evacuano l'intestino nel sedimento pulito. Ciò significa che le misurazioni effettuate subito prima della fase di eliminazione includono il sedimento intestinale contaminato, mentre dopo le prime 4 — 24 ore della fase di eliminazione, si presume che la maggior parte del contenuto intestinale contaminato sia sostituito da sedimento pulito (11) (47). La concentrazione nei vermi di questo campione può pertanto essere considerata come la concentrazione nei tessuti dopo l'evacuazione intestinale. Per tenere conto del fatto che la concentrazione della sostanza in esame viene diluita dal sedimento non contaminato durante la fase di eliminazione, è possibile stimare il peso del contenuto intestinale in base al rapporto peso umido degli animali/peso delle ceneri degli animali oppure peso secco degli animali/peso delle ceneri degli animali.
62. Se la finalità di uno studio specifico è misurare la biodisponibilità e i residui effettivi nei tessuti degli organismi di prova, almeno un sottocampione di animali trattati (ad esempio da tre recipienti di repliche supplementari), prelevati preferibilmente nel corso dello stato stazionario, dovrebbero essere pesati, spurgati in acqua pulita per 6 ore (47), e pesati nuovamente prima dell'analisi. I dati sul peso dei vermi e le concentrazioni corporee di questo sottocampione possono quindi essere confrontati con i valori ottenuti dai vermi a intestino pieno. Per ridurre al minimo lo stress subito dagli animali, quelli destinati alla misurazione dell'eliminazione non dovrebbero essere spurgati prima di essere trasferiti nel sedimento pulito.
63. È preferibile analizzare i campioni di acqua, sedimento e animali subito dopo averli prelevati (ossia entro 1-2 giorni) per evitare il degrado o altre perdite e per calcolare la velocità approssimativa di assorbimento ed eliminazione nel corso della prova. L'analisi immediata consente inoltre di individuare rapidamente l'inizio di una fase di plateau.
64. Se non si effettuano immediatamente le analisi, i campioni dovrebbero essere immagazzinati in condizioni adeguate. Prima di iniziare lo studio è opportuno ottenere informazioni sulla stabilità e le condizioni di stoccaggio adeguate per la sostanza in esame considerata (ad esempio, durata e temperatura di stoccaggio, procedure di estrazione ecc.). Se tali informazioni non sono disponibili ma sono ritenute necessarie, si possono esaminare parallelamente tessuti di controllo addizionati per determinare la stabilità allo stoccaggio.

Qualità del metodo analitico

65. Poiché tutta la procedura è basata sostanzialmente sull'accuratezza, la precisione e la sensibilità del metodo analitico utilizzato per la sostanza in esame, è opportuno controllare sperimentalmente che la precisione e la riproducibilità dell'analisi chimica, e il recupero della sostanza in esame dai campioni di acqua, di sedimenti e vermi, siano soddisfacenti per il metodo in questione. Occorre inoltre verificare che la sostanza in esame non sia rilevabile nei contenitori di controllo in concentrazioni superiori a quelle di fondo. Se necessario, correggere i valori di Cw, Cs e Ca per i recuperi e i valori di fondo dei controlli. Per l'intera durata della prova, manipolare i campioni in modo da ridurre al minimo la contaminazione e le perdite (derivanti, ad esempio, dall'assorbimento della sostanza in esame sul dispositivo di campionamento).
66. Occorre prendere nota e comunicare il recupero globale e il recupero della sostanza in esame nei vermi, nei sedimenti e nell'acqua ma anche, se del caso, nelle soluzioni di trappolamento contenenti assorbenti che trattengono la sostanza di prova evaporata.
67. Visto che è consigliato l'utilizzo di sostanze radiomarcate, è possibile analizzare la radioattività totale (ossia della sostanza madre e dei prodotti di degradazione). Comunque, se possibile sotto il profilo analitico, si ricavano informazioni importanti dalla quantificazione della sostanza madre e dei prodotti di trasformazione allo stato stazionario o alla fine della fase di assorbimento. Se si intende effettuare tali misurazioni, i campioni dovrebbero essere sottoposti ad adeguate procedure di estrazione, in modo che la sostanza madre possa essere quantificata separatamente. Quando un prodotto di degradazione individuato rappresenta una percentuale significativa ($> 10\%$) della radioattività misurata negli organismi di prova allo stato stazionario o al termine della fase di eliminazione, si raccomanda l'individuazione di questi prodotti di degradazione (5).

68. A causa della biomassa individuale ridotta, spesso non è possibile determinare la concentrazione della sostanza di prova in ogni singolo animale, a meno che non si utilizzi Branchiura sowerbyi (40-50 mg di peso umido per animale) come specie sperimentale (11). Il raggruppamento di individui prelevati da un determinato recipiente di prova è accettabile, ma questo limita le procedure statistiche applicabili ai dati. Se una procedura o potenza statistica specifica sono aspetti importanti, allora la prova dovrebbe prevedere un numero adeguato di animali di prova/repliche compatibile con l'aggregazione delle specie e la procedura e la potenza auspicate.
69. Si raccomanda di esprimere il BAF come funzione del peso umido totale, del peso secco totale e, se necessario (ad esempio per sostanze chimiche fortemente lipofiliche), come funzione del contenuto lipidico e del TOC del sedimento. Si devono usare metodi adatti per la determinazione del contenuto lipidico (48) (49). Come metodo standard (48) si può raccomandare la tecnica di estrazione con cloroformio/metanolo (50). Se si vuole evitare l'uso di solventi clorati, si può utilizzare una versione modificata del metodo di Bligh e Dyer (50) descritta in (51), sottoposta a prove interlaboratorio. Poiché i vari metodi non forniscono valori identici (48), è importante precisare il metodo usato. Quando possibile, ad esempio se si dispone di sufficiente tessuto animale, il contenuto lipidico è misurato sullo stesso campione o estratto che è servito per l'analisi della sostanza in esame, in quanto i lipidi spesso devono essere rimossi dall'estratto prima di essere analizzati per via cromatografica (5). Tuttavia, per misurare il contenuto lipidico è opportuno utilizzare animali di controllo acclimatati almeno all'inizio o — preferibilmente — alla fine della fase di assorbimento, ad esempio in tre campioni.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

70. La curva di assorbimento della sostanza in esame si ottiene rappresentando su scala aritmetica la sua concentrazione nel/sugli animali durante la fase di assorbimento in funzione del tempo. Quando la curva ha raggiunto un plateau, occorre calcolare il fattore di bioaccumulo allo stato stazionario (BAF_{ss}) secondo la seguente formula:

$$\frac{C_a \text{ allo stato stazionario o il giorno 28 (media)}}{C_s \text{ allo stato stazionario o il giorno 28 (media)}}$$

71. Determinare il fattore di bioaccumulo cinetico ($BAFK$) come rapporto ks/ke . La costante di eliminazione (ke) è in genere ricavata dalla curva di eliminazione (ossia dal tracciato della concentrazione della sostanza in esame negli animali durante la fase di eliminazione). La costante di velocità di assorbimento ks è calcolata a partire dalla cinetica della curva di assorbimento. Il metodo più indicato per ottenere il $BAFK$ e le costanti di velocità, ks e ke , consiste nell'uso di metodi informatici di stima parametrica non lineare (cfr. appendice 2). Se la curva di eliminazione non obbedisce manifestamente a una cinetica di primo ordine si dovrà ricorrere a modelli più complessi (25) (27) (52).
72. Il fattore di accumulo biota-sedimento ($BSAF$) è determinato normalizzando il $BAFK$ in funzione del contenuto lipidico e del tenore di carbonio organico totale del sedimento.

Interpretazione dei risultati

73. Se le concentrazioni misurate delle soluzioni di prova sono prossime al limite di rivelabilità del metodo analitico, i risultati devono essere interpretati con cautela.
74. Curve di assorbimento e di eliminazione chiaramente definite sono un'indicazione di buona qualità dei dati di bioconcentrazione. In generale, per gli studi adeguatamente strutturati, i limiti di fiducia dei valori del BAF non dovrebbero superare il 25 % (5).

Relazione sulla prova

75. La relazione sulla prova deve contenere le seguenti informazioni:

Sostanza di prova

- natura fisica e proprietà fisico-chimiche, ad esempio $\log K_{ow}$, solubilità in acqua;
- dati di identificazione chimica; provenienza della sostanza in esame, identità e concentrazione di eventuali solventi utilizzati;
- nel caso di sostanza radiomarcata, la posizione degli atomi marcati, la radioattività specifica e la percentuale di radioattività associata alle impurità.

Specie in esame

- nome scientifico, ceppo, provenienza, eventuali pretrattamenti, acclimatazione, età, intervallo di dimensioni ecc.

Condizioni sperimentali

- procedimento di prova utilizzato (ad es. statico, semi-statico o continuo);
- tipo e caratteristiche dell'illuminazione usata e fotoperiodi;
- disegno sperimentale (ad esempio numero, materiale e dimensioni dei contenitori di prova, volume d'acqua, massa e volume del sedimento, velocità di sostituzione del volume d'acqua — per le procedure a flusso continuo o semistatiche, aerazione utilizzata prima e durante la prova, numero di repliche, numero di animali per replica, numero di concentrazioni di prova, durata delle fasi di assorbimento e di eliminazione, frequenza di campionamento);
- metodo di preparazione e applicazione della sostanza di prova, nonché ragioni della scelta di un determinato metodo;
- concentrazioni nominali sperimentali;
- fonte dei componenti dell'acqua e del sedimento artificiali — o se si utilizza un mezzo naturale — origine dell'acqua e del sedimento, descrizione degli eventuali pretrattamenti, risultati di eventuali dimostrazioni della capacità degli animali sperimentali a vivere e/o riprodursi nei mezzi utilizzati, caratteristiche del sedimento (pH e ammoniacal dell'acqua interstiziale — sedimenti naturali), contenuto di carbonio organico (TOC), distribuzione granulometrica (percentuale di sabbia, limo e argilla), tenore di umidità in percentuale, ed eventuali altre misurazioni effettuate) e caratteristiche dell'acqua (pH, durezza, conduttività, temperatura, concentrazione di ossigeno dissolto, livelli residui di cloro (se misurati) ed eventuali altre misurazioni effettuate);
- peso secco nominale e misurato in % del peso umido (o rapporto peso secco/peso umido) del sedimento artificiale; peso secco misurato in % del peso umido (o rapporto peso secco/peso umido) dei sedimenti naturali;
- qualità dell'acqua nei contenitori di prova, caratterizzata da temperatura, pH, tenore di ammoniacal, durezza totale, e concentrazione dell'ossigeno dissolto;
- informazioni esaustive sul trattamento dei campioni di acqua, di sedimento e di animali, ivi compresi dettagli concernenti la preparazione, lo stoccaggio, le procedure di addizione, l'estrazione e le procedure analitiche (e loro precisione) per la sostanza in esame e il contenuto lipidico, e recuperi della sostanza in esame.

Risultati

- mortalità dei vermi di controllo e dei vermi in ogni contenitore di prova e eventuali effetti sub-letali osservati, ivi compresi comportamenti anomali (ad esempio, tendenza ad evitare il sedimento, presenza o assenza di grumi fecali, assenza di riproduzione);
- peso secco misurato in % del peso umido (o rapporto peso secco- peso umido) del sedimento e degli organismi sperimentali (utile per la normalizzazione);
- contenuto lipidico dei vermi;
- curve che mostrano le cinetiche di assorbimento e di eliminazione della sostanza in esame negli animali e tempo necessario per raggiungere lo stato stazionario;
- C_a , C_s e C_w (con deviazione standard e intervallo, se necessario) per tutti i tempi di campionamento (C_a espressa in g/kg di peso umido e secco del corpo intero, C_s espressa in g/kg di peso umido e secco del sedimento e C_w in mg/l). Se è necessario un fattore di accumulo biota-sedimento (BSAF; vedi definizioni all'appendice 1) (ad esempio per confrontare i risultati di due o più prove realizzate su animali con contenuto lipidico diverso), C_a dovrebbe essere espressa anche come g/kg di contenuto lipidico dell'organismo e C_s come g/kg di carbonio organico (CO) del sedimento;

- BAF (espresso in kg di sedimento umido/kg di animali umidi), costante di velocità di assorbimento dal sedimento, k_s (espressa in g di sedimento umido/kg di animali umidi/giorno), e costante di velocità di eliminazione k_e (espressa in giorno⁻¹); eventualmente anche la BSAF (espressa in kg di CO del sedimento/kg di contenuto lipidico dell'animale);
- residui non eliminati (RNE) al termine della fase di eliminazione;
- se misurate: percentuali della sostanza madre, dei prodotti di degradazione e dei residui combinati (ossia percentuale della sostanza in esame che non può essere estratta con i normali metodi di estrazione) rilevate negli animali sperimentali;
- metodi usati per le analisi statistiche dei dati.

Valutazione dei risultati

- conformità dei risultati con i criteri di validità di cui al paragrafo 21;
 - risultati imprevisti o insoliti, ad esempio, eliminazione incompleta della sostanza in esame dagli animali sperimentali; in questi casi i risultati di eventuali studi preliminari possono fornire informazioni utili.
-

Appendice 1

Definizioni e unità

Sedimento artificiale, o sedimento formulato, ricostituito o sintetico: una miscela di materiali usati per simulare i componenti fisici di un sedimento naturale.

Bioaccumulo: aumento di concentrazione della sostanza in esame in o su un organismo rispetto alla concentrazione della sostanza in esame nell'ambiente circostante. Il bioaccumulo è il risultato sia dei processi di bioconcentrazione che di quelli di biomagnificazione (cfr. di seguito).

Fattore di bioaccumulo (BAF) in qualsiasi momento nel corso della fase di assorbimento di questa prova di bioaccumulo è la concentrazione della sostanza in esame in o sull'organismo sperimentale (C_a in g/kg di peso umido o secco) divisa per la concentrazione della sostanza nell'ambiente circostante (C_s espressa in g/kg di peso umido o secco del sedimento). Per ragioni di coerenza con le unità di C_a e C_s , l'unità del BAF è kg di sedimento/kg di vermi (15).

I **fattori di bioaccumulo** calcolati direttamente dal rapporto tra la costante di velocità di assorbimento del sedimento divisa per le costanti di velocità di eliminazione (k_s e k_e rispettivamente, vedi in appresso) sono denominati fattori di bioaccumulo cinetico (BAF_K).

Bioconcentrazione: aumento di concentrazione della sostanza in esame in o su un organismo, derivante esclusivamente dall'assorbimento attraverso la superficie corporea, rispetto alla concentrazione della sostanza in esame nell'ambiente circostante.

Biomagnificazione: aumento di concentrazione della sostanza in esame in o su un organismo, derivante principalmente dall'assorbimento di alimenti o prede contaminati, rispetto alla concentrazione della sostanza in esame negli alimenti o nella preda. La biomagnificazione può comportare un trasferimento o un accumulo della sostanza in esame nelle reti trofiche.

Fattore di accumulo biota-sedimento (BSAF): concentrazione della sostanza in esame allo stato stazionario normalizzata in relazione ai lipidi nel o sull'organismo sperimentale divisa per la concentrazione della sostanza normalizzata in relazione al carbonio organico nel sedimento allo stato stazionario. C_a è pertanto espressa in g/kg di contenuto lipidico dell'organismo, e C_s in g/kg di carbonio organico del sedimento.

Periodo di condizionamento: serve a stabilizzare la componente microbica del sedimento e a eliminare ad es. l'ammoniaca proveniente dai componenti del sedimento; ha luogo prima dell'arricchimento del sedimento con la sostanza in esame. Di norma, l'acqua sovrastante viene scartata dopo il condizionamento.

Eliminazione di una sostanza in esame: perdita della sostanza dai tessuti dell'organismo sperimentale mediante processi attivi o passivi che si verificano indipendentemente dalla presenza o dall'assenza della sostanza nell'ambiente circostante.

Fase di eliminazione: tempo, dopo il trasferimento dell'organismo sperimentale da un ambiente contenente la sostanza in esame ad un ambiente esente da tale sostanza, durante il quale viene studiata l'eliminazione (o perdita netta) della sostanza dagli organismi in esame.

Costante di velocità di eliminazione (k_e): valore numerico che definisce la velocità di riduzione della concentrazione della sostanza in esame nel o sull'organismo sperimentale dopo il trasferimento di quest'ultimo da un ambiente contenente la sostanza in esame ad un ambiente esente da tale sostanza; k_e è espressa in giorno⁻¹.

Periodo di equilibratura: serve a tener conto della distribuzione della sostanza in esame tra la fase solida, l'acqua interstiziale e l'acqua sovrastante; avviene dopo laggiunta della sostanza d'esame nel sedimento e prima dell'aggiunta degli organismi sperimentali.

Coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (K_{ow}): rapporto tra la solubilità della sostanza chimica in n-ottanolo e quella in acqua all'equilibrio, espresso anche come P_{ow} . Il logaritmo di K_{ow} ($\log K_{ow}$) viene usato come indicatore del potenziale di bioaccumulo di una sostanza da parte degli organismi acquatici.

Coefficiente di ripartizione carbono organico-acqua (K_{oc}): rapporto tra la concentrazione di una sostanza nella o sulla frazione di carbonio organico di un sedimento e la concentrazione della sostanza all'equilibrio.

Acqua sovrastante: l'acqua al di sopra del sedimento nel recipiente di prova.

Plateau o stato stazionario: equilibrio tra il processo di assorbimento e quello di eliminazione che si verificano simultaneamente nel corso della fase di esposizione. Lo stato stazionario, nel tracciato del BAF in ogni periodo di campionamento in funzione del tempo, viene raggiunto quando la curva diventa parallela all'asse del tempo e tre analisi successive del BAF su campioni prelevati ad intervalli di almeno due giorni differiscono di non oltre il 20 % una dall'altra, e non vi sono differenze statisticamente significative tra i tre periodi di campionamento. Per le sostanze in esame che vengono assorbite lentamente, intervalli di sette giorni saranno più idonei (5).

Acqua interstiziale: l'acqua che occupa lo spazio tra le particelle di sedimento o di suolo.

Costante di velocità di assorbimento dal sedimento (k_s): valore numerico che definisce la velocità di aumento della concentrazione della sostanza in esame nel o sull'organismo sperimentale derivante dall'assorbimento dalla fase del sedimento k_s è espressa in g di terreno kg⁻¹ di animale giorno⁻¹.

Sedimento addizionato: sedimento al quale è stata aggiunta la sostanza in esame.

Fattore di bioaccumulo allo stato stazionario (BAF_{ss}): BAF allo stato stazionario, che non varia in modo significativo nel corso del tempo, in quanto nel corso di questo periodo la concentrazione della sostanza in esame nell'ambiente circostante (C_s in g/kg-di peso secco o umido del sedimento) rimane costante.

Fase di assorbimento o esposizione: periodo durante il quale gli organismi sperimentali sono esposti alla sostanza in esame.

Appendice 2

Calcolo dei parametri di assorbimento ed eliminazione

Il principale endpoint di una prova di bioaccumulo è il fattore di bioaccumulo BAF. Per calcolare il BAF si divide la concentrazione della sostanza in esame nell'organismo sperimentale, C_a , per la concentrazione della sostanza in esame nel sedimento C_s , allo stato stazionario. Se lo stato stazionario non è raggiunto durante la fase di assorbimento, il BAF è calcolato nello stesso modo per il giorno 28. Va tuttavia annotato se il BAF si basa o meno sulle concentrazioni allo stato stazionario.

La procedura preferita per ottenere il fattore di bioaccumulo cinetico (BAF_K), la costante di velocità di assorbimento dal sedimento (k_e) e la costante di velocità di eliminazione (k_s) consiste nel ricorrere a metodi informatici di stima parametrica non lineare. Data una serie temporale di fattori di accumulo medi ($C_{a,ss}$, valori medi per ciascuna data di campionamento/ C_s , valori medi per ciascuna data di campionamento = AF) della fase di assorbimento, sulla base del peso umido dei vermi e del sedimento e l'equazione tipo

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{k_e \times t}) \quad [\text{equazione 1}]$$

dove $AF(t)$ è il rapporto tra la concentrazione della sostanza di prova nei vermi e la sua concentrazione nel sedimento in momento determinato qualsiasi (t) della fase di assorbimento, questi programmi informatici calcolano i valori di BAF_K , k_s e k_e .

Quando si è raggiunto lo stato stazionario durante la fase di assorbimento (ossia $t = \infty$), l'equazione 1 può essere ridotta a:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \quad [\text{equazione 2}]$$

dove

k_s = costante di velocità di assorbimento nel tessuto [in g di sedimento/kg di verme/giorno]

k_e = costante di velocità di eliminazione [g^{-1}]

In tal caso $k_s/k_e \times C_s$ dà un valore approssimativo della concentrazione della sostanza in esame nel tessuto dell'animale allo stato stazionario ($C_{a,ss}$).

Il fattore di accumulo biota-sedimento (BSAF) dovrebbe essere calcolato nel modo seguente:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

dove f_{oc} è la frazione di carbonio organico del sedimento, e f_{lip} è la frazione di lipidi dei vermi, entrambe basate sul peso secco o sul peso umido.

Data una serie temporale di valori di concentrazione, per modellizzare le cinematiche di eliminazione si possono utilizzare le seguenti equazioni tipo e un calcolo informatico fondato su una stima dei parametri non lineare.

Si raccomanda di utilizzare il residuo corporeo medio misurato alla fine della fase di assorbimento come punto di partenza di default. Il valore modellato/stimato a partire dalla fase di assorbimento dovrebbe essere utilizzato unicamente, ad esempio, se il valore misurato si discosta significativamente dal residuo corporeo modellizzato. Per una variante della pre-esposizione dei vermi destinati all'eliminazione, vedi il paragrafo 50; con questo approccio, si ritiene che i campioni dei vermi pre-esposti il giorno 0 della fase di eliminazione forniscano un valore del residuo corporeo realista con il quale avviare la cinematica di eliminazione.

Se il tracciato dei dati in funzione del tempo indica una diminuzione esponenziale costante della concentrazione della sostanza in esame negli animali, il decorso dell'eliminazione può essere descritto da un modello a comportamento singolo (equazione 4).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad [\text{equazione 3}]$$

I processi di eliminazione talvolta sembrano avvenire in due fasi: dapprima una rapida diminuzione di C_a , che nelle fasi successive dell'eliminazione evolve in una perdita più lenta delle sostanze in esame (8) (19) (25). Le due fasi possono essere interpretate ipotizzando l'esistenza di due compartimenti diversi nell'organismo, a partire dai quali la sostanza in esame è eliminata a velocità diverse. In questi casi è opportuno studiare la letteratura pertinente, ad esempio (15) (16) (17) e (25).

L'equazione (25) ad esempio corrisponde ad un'eliminazione a due compartimenti:

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \quad [\text{equazione 4}]$$

A e B rappresentano la dimensione dei compartimenti (in % del residuo totale nei tessuti), dove A è il compartimento che elimina rapidamente la sostanza e B il compartimento in cui l'eliminazione della sostanza di prova è più lenta. La somma di A e B è pari al 100 % del volume totale del compartimento animale allo stato stazionario; k_a e k_b rappresentano le costanti di eliminazione corrispondenti [g^{-1}]. Se il modello a due compartimenti è adatto ai dati di depurazione, si può calcolare la costante di velocità di assorbimento k_s nel modo seguente (53) (54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times \text{BAF}}{A + B} \quad [\text{equazione 5}]$$

Queste equazioni modellizzate vanno comunque utilizzate con cautela, in particolare se, nel corso della prova, nella sostanza in esame si verificano cambiamenti della biodisponibilità (42).

In alternativa alle equazioni modellizzate illustrate sopra, i parametri cinetici (k_s e k_e), possono essere anche calcolati in una sola volta, applicando un modello di cinetica di primo ordine a tutti i dati delle fasi di assorbimento e di eliminazione. Per una descrizione di un metodo che permetta un tale calcolo combinato delle costanti di velocità di assorbimento ed eliminazione, consultare ad esempio (55), (56) e (57).

I residui non eliminati (NER) dovrebbero essere calcolati come un endpoint secondario moltiplicando per 100 il rapporto tra la concentrazione media negli animali (C_a) il giorno 10 della fase di eliminazione e la concentrazione media negli animali (C_a) allo stato stazionario (giorno 28 della fase di assorbimento):

$$\text{NER}_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{ a fine eliminazione(media)} \times 100}{C_a \text{ allo stato stazionario(media)}}$$

Appendice 3

Esempio di un programma di campionamento per una prova di bioaccumulo di 28 giorni**a) Fase di assorbimento (compresa una fase di equilibratura di 4 giorni)**

Giorno	Attività
- 6	Preparazione di una sospensione di torba per il sedimento; condizionamento della sospensione per 48 ore;
- 4	arricchimento del sedimento o di una frazione del sedimento; miscelazione di tutti i componenti del sedimento; prelievo di campioni di sedimento dal sedimento esposto e da quello di controllo con solvente per determinare la concentrazione della sostanza in esame; aggiunta di acqua sovrastante; incubazione alle condizioni sperimentali (fase di equilibratura);
- 3/- 2	Rimozione degli organismi di prova dall'allevamento per acclimatazione;
0	Misurazione della qualità dell'acqua (cfr. paragrafo 52); rimozione delle repliche per il prelievo di campioni di acqua e di sedimento ai fini della determinazione della concentrazione della sostanza in esame; distribuzione casuale degli animali nei contenitori di prova; accantonamento di un numero sufficiente di sottocampioni di animali per la determinazione dei valori analitici di fondo; controllo dell'alimentazione di aria, se si utilizza un sistema sperimentale chiuso.
1	Prelievo delle repliche per il campionamento; controllo dell'alimentazione di aria, del comportamento degli animali, della qualità dell'acqua (v. paragrafo 56); prelievo di campioni di acqua, sedimento e di animali per determinare la concentrazione della sostanza in esame.
2	Controllo dell'alimentazione di aria, del comportamento degli animali e della temperatura;
3	Idem come il giorno 1;
4 - 6	Idem come il giorno 2;
7	Idem come il giorno 1; compensando l'acqua evaporata se necessario;
8 - 13	Idem come il giorno 2;
14	Idem come il giorno 1; compensando l'acqua evaporata se necessario;
15 - 20	Idem come il giorno 2;
21	Idem come il giorno 1; compensando l'acqua evaporata se necessario;
22 - 27	Idem come il giorno 2;
28	Idem come il giorno 1; misurazione della qualità dell'acqua (cfr. paragrafo 52); fine della fase di assorbimento; accantonamento di un numero sufficiente di sottocampioni di animali per la determinazione dei valori analitici di fondo, del peso umido e secco e del tenore lipidico; trasferimento degli animali dalle repliche rimanenti esposte nei recipienti contenenti sedimento pulito per la fase di eliminazione (senza evacuazione dell'intestino); prelievo di campioni di acqua, di sedimento e di animali dai controlli con solvente; campionamento delle soluzioni di intrappolamento, se previste.
	Le attività che precedono l'esposizione (fase di equilibratura) sono programmate tenendo conto delle proprietà della sostanza in esame. Se necessario, si condiziona il sedimento preparato sotto l'acqua sovrastante a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ per 7 giorni; in questi casi occorre preparare prima il sedimento!
	Le attività descritte per il giorno 2 sono effettuate quotidianamente (almeno nei giorni lavorativi).

b) Fase di eliminazione

Giorno	Attività
- 6	Preparazione di una sospensione di torba per il sedimento; condizionamento della sospensione per 48 ore;
- 4	Miscelazione di tutti i componenti del sedimento; prelievo di campioni di sedimento dal sedimento esposto e da quello di controllo con solvente per determinare la concentrazione della sostanza in esame; aggiunta di acqua sovrastante; incubazione alle condizioni sperimentali;
0 (giorno 28 della fase di assorbimento)	Misurazione della qualità dell'acqua (cfr. paragrafo 52); trasferimento degli animali dalle repliche rimanenti nei recipienti contenenti sedimento pulito; dopo 4 - 6 ore ritiro delle repliche per il prelievo di campioni di acqua, di sedimento e di animali per determinare la concentrazione della sostanza in esame; distribuzione casuale degli animali nei contenitori di prova;
1	Prelievo delle repliche per il campionamento; controllo dell'alimentazione di aria, del comportamento degli animali, della qualità dell'acqua (v. paragrafo 52); prelievo di campioni di acqua, di sedimento e di animali per determinare la concentrazione della sostanza in esame;
2	Controllo dell'alimentazione di aria, del comportamento degli animali e della temperatura;
3	Idem come il giorno 1;
4	Idem come il giorno 2;
5	Idem come il giorno 1;
6	Idem come il giorno 2;
7	Idem come il giorno 1; compensando l'acqua evaporata se necessario;
8 - 9	Idem come il giorno 2;
10	Idem come il giorno 1; fine della fase di eliminazione; misurazione della qualità dell'acqua (cfr. paragrafo 52); campionamento dell'acqua, del sedimento e degli animali dai controlli con solvente; campionamento delle soluzioni di intrappolamento, se previste.
	La preparazione del sedimento prima della fase di eliminazione dovrebbe essere eseguita come la preparazione prima della fase di assorbimento.
	Le attività descritte per il giorno 2 sono effettuate quotidianamente (almeno nei giorni lavorativi).

Appendice 4

Alcune caratteristiche fisico-chimiche di un'acqua di diluizione accettabile

COMPONENTE	CONCENTRAZIONI
Particolato	< 20 mg/l
Carbonio organico totale	< 2 µg/l
Ammoniaca non ionizzata	< 1 µg/l
Cloro residuo	< 10 µg/l
Pesticidi organofosforati totali	< 50 ng/l
Pesticidi organoclorurati totali più difenili policlorurati	< 50 ng/l
Cloro organico totale	< 25 ng/l

COMPOSIZIONE DELL'ACQUA RICOSTITUITA RACCOMANDATA

(a) Soluzione di cloruro di calcio

Dissolvere 11,76 g di $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in acqua deionizzata; portare ad 1 litro con acqua deionizzata.

(b) Soluzione di solfato di magnesio

Dissolvere 4,93 g di $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in acqua deionizzata; portare ad 1 litro con acqua deionizzata.

(c) Soluzione di carbonato di sodio

Dissolvere 2,59 g di NaHCO_3 in acqua deionizzata; portare ad 1 litro con acqua deionizzata.

(d) Soluzione di cloruro di potassio

Dissolvere 0,23 g di KCl in acqua deionizzata; portare ad 1 litro con acqua deionizzata.

Tutti i prodotti chimici devono avere purezza analitica.

La conduttività dell'acqua distillata o deionizzata non deve superare $10 \mu\text{Scm}^{-1}$.

Si miscelano 25 ml di ciascuna soluzione da (a) a (d) e il volume totale è portato a 1 litro con acqua deionizzata. La somma degli ioni di calcio e magnesio in questa soluzione è di 2,5 mmol/l.

Il rapporto ionico Ca:Mg è di 4:1 e quello Na:K è di 10:1. La capacità acida $K_{\text{S4,3}}$ di questa soluzione è di 0,8 mmol/l.

Aerare l'acqua di diluizione fino ad ottenere la saturazione dell'ossigeno, poi conservarla per circa due giorni senza ulteriore aerazione prima dell'utilizzo.

Il pH di un'acqua di diluizione accettabile dovrebbe situarsi tra 6 e 9.

Appendice 5

Sedimento artificiale — raccomandazioni per la preparazione e la conservazione

Contrariamente alle prescrizioni di cui al metodo di prova C.8 (40), per il sedimento artificiale si raccomanda un tenore di torba del 2 % piuttosto che del 10 % del peso secco, in modo da corrispondere ad un tenore organico da basso a moderato di sedimenti naturali (58).

Percentuale di componenti secchi del sedimento artificiale:

Componenti	Caratteristiche	% del sedimento secco
Torba	Torba di sfagno, grado di decomposizione: "medio", essiccata all'aria, priva di residui vegetali, finemente macinata (granulometria $\leq 0,5$ mm)	2 \pm 0,5
Sabbia di quarzo	Granulometria: ≤ 2 mm, > 50 % delle particelle ha dimensioni comprese tra 50 e 200 μm	76
Argilla caolinica	Tenore di caolinite ≥ 30 %	22 \pm 1
Fonte alimentare	Folia urticae, foglie in polvere di <i>Urtica</i> sp. (ortica), finemente macinate (granulometria $\leq 0,5$ mm), o una miscela di foglie in polvere di <i>Urtica</i> sp. con alfa cellulosa (1: 1); conformemente alle norme farmaceutiche per il consumo umano; in aggiunta al sedimento secco	0,4 - 0,5 %
Carbonato di calcio	CaCO_3 , in polvere, chimicamente puro, in aggiunta al sedimento secco	0,05 - 1
Acqua deionizzata	Conduttività $\leq 10 \mu\text{S}/\text{cm}$, in aggiunta al sedimento secco	30 - 50

Se si prevedono forti concentrazioni di ammoniaca, ad esempio se la sostanza in esame è nota per la sua capacità di inibire la nitrificazione, può essere opportuno sostituire 50 % della polvere di ortica ricca di azoto con cellulosa (ad es. polvere di α -cellulosa, chimicamente pura, granulometria $\leq 0,5$ mm)

Preparazione

Far essiccare all'aria e macinare finemente la torba (granulometria $\leq 0,5$ mm, priva di residui vegetali visibili). Con un omogeneizzatore ad alte prestazioni, preparare una sospensione della quantità richiesta di polvere di torba utilizzando parte dell'acqua deionizzata da aggiungere al sedimento secco (un volume di acqua pari a 11,5 volte il peso secco di torba produce una sospensione di torba agitabile (8)).

Aggiustare il pH della sospensione a $5,5 \pm 0,5$ con CaCO_3 . Tenere per almeno due giorni la sospensione a 20 ± 2 °C agitandola leggermente per stabilizzare il pH e favorire la costituzione di una flora microbica stabile. Misurare nuovamente il pH e aggiustare a $6,0 \pm 0,5$ con CaCO_3 se necessario. Successivamente l'insieme della sospensione è mescolato agli altri componenti secchi, tenendo conto delle parti eventualmente utilizzate per l'addizione. L'acqua deionizzata rimanente è aggiunta per ottenere un sedimento omogeneo. Misurare nuovamente il pH e portarlo a 6,5-7,5 con CaCO_3 se necessario. Tuttavia, se si prevede la formazione di ammoniaca, può essere opportuno tenere il pH del sedimento sotto 7,0 (ossia tra 6,0 e 6,5). Prelevare campioni del sedimento per determinare il peso secco e il tenore di carbonio organico. Se si prevede la formazione di ammoniaca, il sedimento artificiale può essere condizionato per sette giorni alle stesse condizioni in cui verrà realizzata la prova (ad es. rapporto sedimento- acqua 1: 4, altezza dello strato di sedimento come nei recipienti di prova) prima di aggiungere la sostanza in esame, ad esempio potrebbe essere ricoperto di acqua sottoposta ad aerazione. Al termine del periodo di condizionamento, l'acqua sovrastante dovrebbe essere prelevata e eliminata. Prelevare campioni del sedimento per determinare il peso secco e il tenore totale di carbonio organico (ad es. 3 campioni)

Successivamente, mescolare la sabbia di quarzo addizionata con il sedimento per ciascun livello di esposizione, ripartire il sedimento nei recipienti di prova delle repliche e ricoprirla con l'acqua di prova (ad es. rapporto sedimento- acqua 1: 4, altezza dello strato di sedimento come nei recipienti di prova). I recipienti sono successivamente sottoposti ad incubazione alle stesse condizioni in cui verrà realizzata la prova. A questo punto inizia la fase di equilibratura. L'acqua sovrastante dovrebbe essere aerata.

La fonte di alimentazione scelta dovrebbe essere aggiunta prima o durante l'addizione della sostanza di esame nel sedimento. Inizialmente può essere mescolata alla sospensione di torba (vedi sopra). Tuttavia, si può evitare un'eccessiva degradazione della fonte alimentare prima di introdurre gli organismi di prova — ad esempio, in caso di un lungo periodo di equilibratura — riducendo il più possibile l'intervallo tra l'aggiunta degli alimenti e l'inizio dell'esposizione. Al fine di garantire che tra il cibo e la sostanza di prova avvenga un contatto sufficiente, la fonte alimentare dovrebbe essere mescolata con il sedimento al più tardi il giorno in cui la sostanza in esame è aggiunta al sedimento. Si possono ammettere eccezioni, se la durata del periodo di equilibratura comporta un'eccessiva degradazione microbica degli alimenti prima dell'aggiunta degli organismi di prova. Campioni di sedimento sono prelevati per determinare il peso secco e il tenore di carbonio organico totale (ad es. 3 campioni di sedimento addizionato o di controllo).

Il peso secco dei componenti (torba, sabbia, caolino) dovrebbe essere espresso in g e in percentuale del peso secco totale.

Il volume di acqua da aggiungere ai componenti secchi durante la preparazione del sedimento dovrebbe anch'esso essere espresso in percentuale del peso secco totale (ad esempio 100 % di peso secco + 46 % di acqua significa che un peso secco di 1 000 g riceve un totale di 460 ml di acqua, determinando un sedimento umido di 1 460 g).

Stoccaggio

I componenti secchi del sedimento artificiale possono essere conservati in un luogo fresco e asciutto, a temperatura ambiente. Il sedimento umido preparato può essere conservato (solo per essere utilizzato successivamente nella coltura) a 4 ± 2 °C al buio per un periodo compreso tra 2 e 4 settimane a partire dal giorno della preparazione (8).

Una volta addizionata la sostanza in esame, il sedimento dovrebbe essere utilizzato immediatamente, a meno che non si abbiano informazioni che indicano la possibilità di conservarlo senza alterare la tossicità e la biodisponibilità della sostanza in esame. I campioni di sedimento addizionato possono essere conservati fino al momento dell'analisi alle condizioni raccomandate per la sostanza in esame.

Appendice 6

Specie di oligocheti raccomandate per le prove di bioaccumulo

Tubifex tubifex (MÜLLER), Tubificidae, Oligochaeta

Gli oligocheti tubificidi (Tubificidae, Oligochaeta) *Tubifex tubifex* (Müller) vivono in sedimenti di acqua dolce in tubi rivestiti di muco. I vermi vivono in questi tubi a testa in giù, ingerendo particelle di sedimento e utilizzando i microorganismi e i detriti organici associati. La parte posteriore di solito ondula nell'acqua sovrastante per consentire all'animale di respirare. Sebbene questa specie sia presente in una vasta gamma di tipi di sedimenti in tutto l'emisfero settentrionale, *Tubifex tubifex* preferisce le granulometrie di piccole dimensioni (59). L'idoneità di questa specie per le prove ecotossicologiche sono descritte ad esempio in (8) (29) (31) (39) (60) (62) (63).

Metodi di allevamento

Al fine di disporre di un numero sufficiente di *Tubifex tubifex* per lo svolgimento di prove di bioaccumulo gli animali devono essere conservati in un allevamento di laboratorio permanente. Per l'allevamento di *T. tubifex* (8) si raccomanda un sistema costituito da sedimento artificiale basato sul suolo artificiale, secondo il metodo di prova C.8 (40), e da acqua ricostituita secondo il metodo di prova C.1.

Come recipienti di allevamento possono essere utilizzati contenitori di vetro o acciaio inossidabile di un'altezza da 12 a 20 cm. In ogni contenitore si ripone uno strato di sedimento artificiale umido preparato come descritto nell'appendice 5. La profondità dello strato sedimentario dovrebbe consentire ai vermi di adottare un comportamento fossorio naturale (2 cm di profondità minima per *T. tubifex*). Al sistema viene aggiunta acqua ricostituita. Si avrà cura di arrecare il minor disturbo possibile al sedimento. Il corpo idrico è delicatamente aerato (ad esempio 2 bolle al secondo con aria filtrata a 0,45 µm) per mezzo di una pipetta Pasteur collocata a 2 cm sopra la superficie del sedimento. La temperatura raccomandata per l'allevamento è di 20 ± 2 °C.

I vermi sono aggiunti al sistema di allevamento con un carico massimo di 20 000 esemplari/m² di superficie di sedimento. Un carico superiore può provocare una riduzione della velocità di crescita e di riproduzione (43).

Negli allevamenti con sedimento artificiale, gli animali devono essere alimentati. Come nutrimento addizionale si può utilizzare un mangime per pesci finemente tritato, ad esempio TetraMin® (8); Klerks 1994, comunicazione personale. La frequenza dell'alimentazione deve consentire una crescita e una riproduzione sufficienti, limitando nel contempo al massimo l'accumulo di ammoniaca e la proliferazione di funghi. Il mangime può essere somministrato due volte a settimana (ad es. da 0,6 a 0,8 per cm² di superficie del sedimento). L'esperienza pratica ha dimostrato che l'utilizzo di mangime omogeneizzato e sospeso in acqua deionizzata può facilitarne la distribuzione omogenea sulla superficie del sedimento nei contenitori di allevamento.

Per evitare l'accumulo di ammoniaca, l'acqua sovrastante dovrebbe essere cambiata mediante un sistema a flusso continuo o, almeno una volta alla settimana, manualmente. Negli allevamenti di partenza, il sedimento dovrebbe essere cambiato ogni tre mesi.

Se servono solo vermi adulti, si può effettuare il campionamento setacciando il sedimento di allevamento con un setaccio a maglie di 1mm. Per prelevare bozzoli, servono maglie di 0,5 mm e per prelevare esemplari giovani maglie di 0,25 mm. Dopo il setacciamento del sedimento, i setacci possono essere riposti in acqua ricostituita. Gli animali si allontano dalle maglie del setaccio e possono essere prelevati dall'acqua con delle pinze in acciaio dolce o con una pipetta dai bordi ribruciati.

Solo esemplari intatti e chiaramente individuati di *Tubifex tubifex* (ad esempio (64)) sono utilizzati per avviare una prova o nuovi allevamenti. I vermi malati o feriti e i bozzoli infestati da ife fungali devono essere scartati.

Una cultura sincronizzata può consentire di disporre di vermi di una determinata età a intervalli adeguati. Nuovi recipienti di allevamento sono allestiti alla frequenza desiderata (ad esempio ogni due settimane), iniziando con animali di una età nota (ad esempio bozzoli). Alle condizioni di coltura qui descritte gli animali diventano adulti dopo 8-10 settimane. Si possono prelevare gli esemplari dagli allevamenti quando i vermi hanno formato nuovi bozzoli, ad esempio, dopo dieci settimane. Gli adulti selezionati possono essere utilizzati per le prove e si possono avviare nuovi allevamenti con i bozzoli.

Lumbriculus variegatus (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta

Il *Lumbriculus variegatus* (Lumbriculidae, Oligochaeta) vive anch'esso nei sedimenti di acqua dolce di tutto il mondo ed è ampiamente utilizzato nelle prove ecotossicologiche. Si possono reperire informazioni sulla biologia, le condizioni di coltura e la sensibilità della specie in (1) (6) (9) (36). Il *Lumbriculus variegatus* può anche essere allevato nel sedimento artificiale raccomandato per il *T. tubifex* conformemente a (8), se pur con alcune limitazioni. Dal momento che in natura *L. variegatus* preferisce sedimenti più grossolani rispetto al *T. tubifex* (59), gli allevamenti di laboratorio con il sedimento artificiale utilizzati per *T. tubifex* possono cessare dopo 4-6 mesi. L'esperienza pratica ha dimostrato che *L. variegatus* può essere conservato, per vari anni e senza rinnovare il substrato, in un substrato sabbioso (ad esempio sabbia di quarzo, ghiaia fine), in un sistema a flusso continuo e alimentato con mangime per pesci. Uno dei principali vantaggi di *L. variegatus* rispetto ad altre specie di oligocheti acquatici è la rapida riproduzione, con conseguente veloce aumento della biomassa nelle popolazioni allevate in laboratorio (1) (6) (9) (10).

Metodi di allevamento

Le condizioni di allevamento per il *Lumbriculus variegatus* sono illustrate in Phipps et al. (1993) (10), Brunson et al. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). Una breve sintesi di queste condizioni è riportata qui di seguito.

Gli animali possono essere allevati in grandi acquari (57-80 l) a 23 °C, con un fotoperiodo 16L:8O (100-1 000 lux), utilizzando acqua naturale rinnovata quotidianamente (45-50 litri per acquario). Il substrato viene preparato tagliando tovaglioli di carta riciclata non sbiancata in striscioline che possono essere successivamente mescolate all'acqua di allevamento per qualche secondo, diventando così piccoli pezzi di substrato di carta. Questo substrato può essere direttamente utilizzato per ricoprire il fondo del recipiente degli acquari di allevamento di *Lumbriculus* o essere conservato congelato in acqua deionizzata per un uso successivo. Un nuovo substrato dura in genere circa due mesi.

Ciascun allevamento è avviato con 500 -1 000 animali e alimentato con 10 ml di una sospensione contenente 6 grammi di uno starter a base di trota, 3 volte alla settimana in condizioni di flusso continuo o di rinnovo. Gli allevamenti statici o semistatici dovrebbero essere alimentati con minor frequenza al fine di evitare lo sviluppo di batteri e di funghi. Il substrato di cibo e carta dovrebbe essere analizzato per individuare la presenza delle sostanze utilizzate nelle prove di bioaccumulo.

In queste condizioni, il numero di individui nell'allevamento in generale raddoppia in 10-14 giorni.

Il *Lumbriculus variegatus* può essere prelevato dall'allevamento, trasferendo in un becher separato il substrato con una rete a maglia molto fine o gli animali mediante una pipetta di vetro a bocca larga dai bordi ribruciati (circa 5 mm di diametro). Se nel recipiente viene trasferito anche del substrato, il becher contenenti vermi e substrato è lasciato per una notte in condizioni di flusso continuo, il che permetterà di eliminare il substrato, mentre gli animali rimangono sul fondo del recipiente. Essi possono quindi essere riposti in recipienti di allevamento di nuova preparazione o trattati ulteriormente per la prova, come indicato in (1) e (6). Occorre fare il possibile per non causare ferite o autotomie negli animali, ad esempio utilizzando pipette con i bordi ribruciati o pinzette in acciaio inossidabile per la manipolazione di questi animali.

Un aspetto fondamentale di cui tener conto quando si utilizza *L. variegatus* nelle prove di bioaccumulo è la sua modalità di riproduzione (architomia seguita da morfallassi). Questa riproduzione asessuata dà luogo a due frammenti, che non si alimentano per un certo periodo fino a quando la parte della testa o della coda si rigenera (ad esempio (36) (37)). Ciò significa che in *L. variegatus* l'assorbimento del sedimento e del contaminante per ingestione non può avvenire in modo continuato come nei tubificidi, che non si riproducono per frammentazione.

Occorre dunque effettuare una sincronizzazione per ridurre al minimo la riproduzione e la rigenerazione non controllate che determinerebbero una notevole variazione dei risultati sperimentali. Tali variazioni possono verificarsi quando alcuni esemplari, che si frammentano e quindi non si alimentano per un certo periodo di tempo, sono meno esposti alla sostanza in esame rispetto ad altri animali, che non subiscono una frammentazione durante la prova, ad esempio (38). Da 10 a 14 giorni prima dell'inizio dell'esposizione, i vermi dovrebbero essere frammentati artificialmente (sincronizzazione) (65). È opportuno utilizzare animali di grandi dimensioni che (se possibile) non mostrano segni di frammentazione recente. Questi animali possono essere posti su un vetrino in una

goccia di acqua di coltura e sezionati nella regione mediana del corpo con un bisturi. Occorre fare in modo che le estremità posteriori siano di dimensioni analoghe. Prima di iniziare l'esposizione bisogna quindi aspettare che le estremità posteriori rigenerino nuove teste in un recipiente contenente lo stesso substrato utilizzato nell'allevamento e acqua ricostituita. La rigenerazione delle nuove teste è indicata dal comportamento fossorio di questi vermi nel substrato (la presenza delle teste rigenerate può essere confermata da un esame di un sottocampione rappresentativo al microscopio binoculare). Si presuppone che gli organismi sperimentali si trovino successivamente in uno stato fisiologico simile. Quando nel corso della prova nei vermi sincronizzati si verifica la rigenerazione per morfallassi, si presuppone pertanto che tutti gli animali siano esposti in egual misura al sedimento addizionato. La somministrazione di cibo ai vermi sincronizzati dovrebbe aver luogo non appena i vermi cominciano a infossarsi nel substrato, o 7 giorni dopo la dissezione. Il tipo di alimentazione deve essere analogo a quello degli allevamenti normali, ma può essere opportuno alimentare i vermi sincronizzati con la stessa fonte alimentare utilizzata nel corso della prova. I vermi devono essere tenuti alla temperatura di prova, $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Dopo la rigenerazione, occorre usare per la prova vermi completi, intatti e di dimensioni analoghe, che nuotano o strisciano attivamente se leggermente stimolati. Occorre fare il possibile per non causare ferite o autotomie negli animali, si consigli di manipolare gli animali con pipette con i bordi ribruciati o pinzette in acciaio inossidabile.

Quando in una prova si utilizza *Lumbriculus variegatus*, date le particolari modalità di riproduzione di questa specie, se le condizioni sono adeguate dovrebbe verificarsi un aumento del numero di animali (6). La mancata riproduzione in una prova di bioaccumulo con *L. variegatus* dovrebbe essere registrata e considerata nell'interpretazione dei risultati delle prove.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificidae, Oligochaeta (non validato con prova interlaboratorio)**

I *Branchiura sowerbyi* vivono in una serie di tipi di sedimenti in bacini, laghi, stagni, fiumi, originariamente in zone tropicali. Essi sono presenti anche in corpi di acqua calda dell'emisfero settentrionale. Tuttavia, sono più abbondanti nei sedimenti di fango argilloso ad elevato tenore di materia organica. Vivono nello strato di sedimento; anche l'estremità posteriore dei vermi di norma è infossata. Questa specie è facilmente riconoscibile per i filamenti branchiali presenti sulla parte posteriore del corpo. Gli esemplari adulti possono raggiungere una lunghezza di 9-11 cm e un peso umido di 40-50 mg. I vermi presentano un elevato tasso di riproduzione, con tempi di raddoppio della popolazione inferiori a 2 settimane, alle condizioni di temperatura e alimentazione descritte qui di seguito (Aston et al., 1982, (65)). *B. sowerbyi* è stato utilizzato in studi di tossicità e di bioaccumulo (Marchese & Brinkhurst 1996, (31) Roghair et al. 1996, (67) rispettivamente).

Metodi di allevamento

Qui di seguito è riportata una sintesi delle condizioni di allevamento di *Branchiura sowerbyi* (fornita da Mercedes R. Marchese, INALI, Argentina, e Carla J. Roghair, RIVM, Paesi Bassi).

Non esiste una tecnica unica per l'allevamento di questi organismi di prova. Gli organismi possono essere allevati utilizzando sedimento naturale non contaminato (31). L'esperienza pratica ha dimostrato che un mezzo costituito da sedimenti naturali e sabbia migliora le condizioni degli animali rispetto al solo sedimento naturale puro (32) (67). Per l'allevamento possono essere utilizzati dei becher di 3 litri contenenti 1 500 ml di mezzo costituito da sedimento e acqua consistente in 375 ml di sedimento naturale non contaminato (circa 10 % di carbonio organico totale, circa 17 % di particelle $\leq 63 \mu\text{m}$), 375 ml di sabbia pulita (M32) e 750 ml di acqua di rubinetto ricostituita o senza cloro (31) (32) (67). Come substrato di allevamento si possono anche utilizzare asciugamani di carta, ma la crescita della popolazione è inferiore rispetto a quella registrata con il sedimento naturale. Nei sistemi semistatici lo strato d'acqua nel becher è aerato lentamente e l'acqua sovrastante deve essere cambiata con cadenza settimanale.

Ciascun becher all'inizio contiene 25 giovani animali. Dopo due mesi i vermi di grandi dimensioni sono prelevati con delle pinzette dal sedimento e sono collocati in un becher nuovo contenente un mezzo costituito da sedimento/acqua di nuova preparazione. Il vecchio becher contiene anche bozzoli e giovani animali. In questo modo si possono ottenere fino a 400 giovani vermi per becher. I vermi adulti possono essere utilizzati per la riproduzione per almeno un anno.

Gli allevamenti dovrebbero essere mantenuti a una temperatura compresa tra 21 e 25°C . La variazione di temperatura deve essere mantenuta al di sotto di $\pm 2^\circ\text{C}$. I tempi di sviluppo embrionale, dalla deposizione dell'uovo alla fuoriuscita dal bozzolo dell'animale, è di circa tre settimane a 25°C . La produzione di uova ottenuta per verme sopravvissuto nei *B. sowerbyi* è risultata compresa tra 6,36 (31) e 11,2 (30) nel fango a 25°C . Il numero di uova per bozzolo va da 1,8 a 2,8 (66) (69), o fino a 8 (68).

Ossigeno disiolto, durezza dell'acqua, temperatura e pH dovrebbero essere misurati ogni settimana. Alla sospensione si può aggiungere un mangime per pesci (ad esempio Tetramin®) come sospensione due o tre volte alla settimana a volontà. Gli animali possono essere nutriti anche con lattuga scongelata a volontà.

Uno dei principali vantaggi di questa specie è l'elevata biomassa individuale (fino a 40-50 mg di peso umido per individuo). Pertanto può essere utilizzata per le prove di bioaccumulo di sostanze in esame non radiomarcate. Può essere esposta nei sistemi usati per *T. tubifex* o *L. variegatus* con un singolo individuo per replica (11). Il numero di repliche può tuttavia essere aumentato, a meno che non si utilizzino contenitori di prova più grandi (11). Inoltre, il criterio di validità relativo al comportamento fossorio deve essere adeguato per questa specie.

BIBLIOGRAFIA

- (1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (2) Commissione europea (2003). *Technical Guidance Document on Risk Assessment* in relazione alla direttiva 93/67/CEE della Commissione relativa alla valutazione dei rischi delle nuove sostanze notificate, al regolamento (CE) n. 1488/94 relativo alla valutazione dei rischi delle sostanze esistenti e alla direttiva 98/8/CE del Parlamento europeo e del Consiglio relativa all'immissione sul mercato dei biocidi; Parti I — IV. Ufficio delle pubblicazioni delle Comunità europee, Lussemburgo.
- (3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.
- (4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.
- (5) Chapter C.13 of this Annex, Bioconcentration Flow Thorough Fish test.
- (6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (7) Chapter C.27 of this Annex, Sediment water Chironomid toxicity test using spiked sediment
- (8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., laboratori di sezionamento, Th., Franke, G., C., Studinger & Nagel R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.
- (9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry, 22, 872-885.
- (10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.toxicol. Chem. 12, 269-279.
- (11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on "Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes", 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- (12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnäß, H.J. & Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with freaticoli aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D No.: 202 67 437.

- (13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. & Morton, R.D. (1990) Effects of tributyltin within a *Thalassia* seagrass ecosystem. *Estuaries* 13, 301-310.
- (14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. In: R. Nagel and R. Loskill (eds): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim
- (15) Landrum, P.F., Lee II, H., & Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1709-1725.
- (16) Markwell, R.D., Connell, D.W. & Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. *Wat. Res.* 23, 1443-1450.
- (17) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. *Wat. Res.* 24, 1225-1231.
- (18) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
- (19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. and Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29, 1501-1514.
- (20) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.
- (22) I seguenti capitoli del presente allegato:
- Capitolo A.4 — Tensione di vapore
- Capitolo A.5 — Tensione superficiale
- Capitolo A.6 — Solubilità in acqua
- Capitolo A.8 — Coefficiente di ripartizione (metodo del dibattimento in pallone)
- Capitolo A.24 — Coefficiente di ripartizione, metodo HPLC
- Capitolo C.7 — Degradazione — degradazione abiotica: idrolisi in funzione del pH
- Capitolo C.4 A-F Determinazione della "pronta" (ready) biodegradabilità.
- Capitolo C.19 — Stima del coefficiente di adsorbimento (KOC) sul terreno e sui fanghi di acque da scarico mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).
- Capitolo C.29 — Pronta biodegradabilità — CO₂ in recipienti ermetici
- (23) OCSE (1996). Direct Phototransformation Of Chemicals In Water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No. OCSE, Parigi.
- (24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. & Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. *Microchem. J.* 43, 165-172.
- (25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke & G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- (26) Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organic in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- (27) Hawker, D.W. & Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22, 701-707.
- (28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.

- (29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. and Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm *Tubifex tubifex*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1061-1072.
- (30) Aston, R.J. & Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. *Aquaculture* 26, 155-160.
- (31) Marchese, M.R. & Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. *Hydrobiologia* 334, 163-168.
- (32) Roghair, C.J. & Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. *RIVM Report* 719102027.
- (33) Capitolo C.1 del presente allegato — Pesci, prova di tossicità acuta.
- (34) OCSE (1992c). Linea guida per le prove sulle sostanze chimiche n. 210. Prova di tossicità su pesci nelle prime fasi di vita. OCSE, Parigi.
- (35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. *Hydrobiologia* 11, 181-184.
- (36) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (37) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
- (38) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.
- (39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. *Ecotoxicology* 8, 111-124.
- (40) Capitolo C.8 del presente allegato — Test di tossicità acuta per i lombrichi.
- (41) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.
- (42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Toxicol.* 23, 588-595.
- (43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). In: R.O. Brinkhurst and D.G. Cook (eds.): *Aquatic Oligochaeta Biology*, 175-184. Plenum Press, New York.
- (44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.
- (45) Hooftman, R.N., van de Guchte, K. & Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. *RIVM-719102022*.
- (46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. *Chemosphere* 32, 1897-1905.
- (47) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1244-1249.
- (48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. & Pruett, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1431-1436.
- (49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography*, 30, 1099-1105.

- (50) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- (51) De Boer, J., smedes, F., pozzetti, D. & Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.
- (53) Zok, S., Görge, G., Kalsch, W. & Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Sci. Total Environment* 109/110, 411-421
- (54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und fische — Beiträge zu einer Bewertung. *Abilitationsschrift*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.
- (55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.
- (56) Van Brummelen, T.C. & Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.
- (57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.
- (58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1163-1175.
- (59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. *Arch. Hydr.* 63, 310-386.
- (60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. *Environ. Sci. Technol.* 21, 785-790.
- (61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 47-67.
- (62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 69-78.
- (63) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): *Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality*. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. *Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ.* No. 22.
- (65) Egeler, Ph., Meller, M., schallnaß, H.J. & gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the freaticoli aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.
- (66) Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. *Aquaculture* 29, 137-145.

-
- (67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. & Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge *Chironomus riparius* and the tubificid oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719101026.
- (68) Aston, R.J. (1984). The culture of *Branchiura sowerbyi* (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. *Aquaculture* 40, 89-94.
- (69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia* 278:267-274.»
-