

ASPETTI ECOTOSSICOLOGICI NELLA CARATTERIZZAZIONE DEI RIFIUTI: TRA NORMA E RICERCA NELL'AMBITO DELLA PREVENZIONE

by L. Musmeci ^a, I. Lacchetti ^B, F. Tommasi ^c, P. M. B. Gucci ^d, E. Beccaloni ^e, M. Carere ^f, S. Marcheggiani ^g, C. Puccinelli ^h, S. Caciolli ⁱ, L. Mancini ^L

^a Istituto Superiore di Sanità - loredana.musmeci@iss.it

^b Istituto Superiore di Sanità - ines.lacchetti@iss.it

^c Istituto Superiore di Sanità - federica.tommasi@iss.it

^d Istituto Superiore di Sanità - paola.gucci@iss.it

^e Istituto Superiore di Sanità - eleonora.beccaloni@iss.it

^f Istituto Superiore di Sanità - mario.carere@iss.it

^g Istituto Superiore di Sanità - stefania.marcheggiani@iss.it

^h Istituto Superiore di Sanità - camilla.puccinelli@iss.it

ⁱ Istituto Superiore di Sanità - silvana.caciolli@iss.it

^L Istituto Superiore di Sanità - laura.mancini@iss.it

Abstract – In Italia con la conversione in legge del D.L. 2/2012, si definiscono le modalità di attribuzione delle caratteristiche di pericolosità ai rifiuti, in particolare, per ciò che concerne l' Ecotossico (H14) i criteri da seguire sono quelli riportati nell'allegato VI della Direttiva 67/548/CEE secondo le modalità dell'accordo europeo Accord Dangerous par Route (ADR) per la classe 9 "materie pericolose per l'ambiente acquatico liquide (categoria M6) e solide (categoria M7). E' prevista, l'esecuzione di una batteria di tre saggi ecotossicologici con organismi acquatici (alghe, Daphnia e pesci) da applicare ai rifiuti di composizione sconosciuta. L'applicazione di questa procedura, tuttavia, comporta diversi problemi operativi, in particolare per ciò che riguarda l'esecuzione del saggio acuto con pesci adulti. In questo contesto l'Istituto Superiore di Sanità sta svolgendo attività di studio e ricerca sperimentale al fine di individuare valide alternative al test su pesci adulti e di accrescere, contemporaneamente, le informazioni sulla pericolosità del rifiuto, ad esempio con l'aggiunta di biomarker tra i saggi previsti. Nel presente lavoro si riportano i dati della sperimentazione riguardante una batteria di test alternativi applicati a campioni di rifiuto di diversa origine.

Keywords: rifiuti, ecotossicità, FET, micronuclei, *Vibrio fischeri*

Introduzione

In Italia con l' entrata in vigore della legge 24 marzo 2012, n. 28 e s.m.i. "*Conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 25 gennaio*

2012, n. 2, recante misure straordinarie e urgenti in materia ambientale" (Italia, 2012) si ridefinisce la procedura tecnica per l'attribuzione ai rifiuti della caratteristica di pericolo H14 - ecotossico per l'ambiente. In particolare, si rimanda all'Accordo internazionale Accord Dangereuses par Route (A.D.R.), sintesi di "Accord european relatif au transport international des marchandises dangereuses par route", in merito ai criteri da seguire, per quanto concerne la classe 9 (Materie e oggetti pericolosi diversi) categoria M6 (Materie pericolose per l'ambiente acquatico, liquide) e categoria M7 (Materie pericolose per l'ambiente acquatico, solide).

L'ADR prevede l'allestimento di una batteria di tre saggi con organismi acquatici per quei rifiuti a composizione non determinabile e con "voci specchio", facendo riferimento ai metodi descritti dalle linee guida Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (N.201 test di inibizione di crescita algale, N.202 test acuto di immobilizzazione con *Daphnia magna*, N.203 test acuto su pesci) (OECD, 2006; 2004; 1992).

L'applicazione di questa procedura, tuttavia, comporta diverse problematiche pratico-operative, per ciò che riguarda soprattutto l'esecuzione del saggio acuto con pesci adulti.

L'Istituto Superiore di Sanità sta svolgendo da diversi anni attività di studio e ricerca sperimentale con lo scopo di fornire risposte concrete a tali quesiti e supportare in tal modo la normativa vigente. Nel dettaglio, si sta cercando di individuare una valida alternativa al saggio acuto su pesci adulti anche in accordo con quanto indicato dalla Direttiva Europea 2010/63/EU sulla protezione degli animali usati a fini sperimentali e recepita in Italia con il D. Lgs n. 26 del 4 marzo 2014 (Europa, 2010; Italia, 2014). A tal riguardo nella sperimentazione sui rifiuti si stanno utilizzando il test con il batterio *Vibrio fischeri* e il "Fish Embryo Toxicity" (FET) Test (OECD 236) (OECD, 2013). In particolare il FET può fornire analoghe e sovrapponibili informazioni sulla valutazione della tossicità acquatica trasposta a livelli trofici più elevati pur presentando minori difficoltà pratico-operative rispetto

Si sta cercando, inoltre, di migliorare la conoscenza di pericolosità del rifiuto per una corretta prevenzione del rischio sia per l'ambiente che per la salute umana, aggiungendo i biomarker nella batteria prevista dalla normativa (test dei micronuclei con *Vicia faba*).

Materiali e metodi

La sperimentazione è stata condotta su quattro campioni di rifiuto di differente tipologia.

Gli elutriati dei campioni sono stati preparati secondo quanto riportato nella procedura UNI EN 14735/2005. Sono state preparate opportune diluizioni degli elutriati per il calcolo delle EC50, che quindi verranno espresse come percentuali e non in termini di concentrazione (mg/L).

Gli elutriati e le relative diluizioni sono stati testati con la batteria di saggi riportati in Tabella 1.

Tabella 1: Set di test utilizzati in questo studio

Saggi	Note
Test di inibizione di crescita con <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Parametro obbligatorio *
Test di immobilizzazione con <i>Daphnia magna</i>	Parametro obbligatorio *
Test Microtox con <i>Vibrio fischeri</i>	Non previsto Precedentemente proposta parere ISS-ISPRA n. 40832/2011 (http://www.reteambiente.it/repository/normativa/15590_b.pdf)
Fish Embryo Toxicity (FET) Test con <i>Danio rerio</i>	Non previsto in sostituzione del test su pesci adulti
Test dei micronuclei con <i>Vicia faba</i>	Non previsto biomarker

* (Italia, 2012)

Il Test di inibizione di crescita con alghe d'acqua dolce e il Test acuto di immobilizzazione con *Daphnia magna* sono stati effettuati seguendo le procedure OECD rispettivamente 201 e 202. Il Test di tossicità acuta con *Vibrio fischeri* è stato eseguito seguendo le procedure standard ISO 11348:2007 utilizzando lo strumento Microtox.

Fish Embryo Acute Toxicity (FET)

Il FET Test utilizza la specie ittica *Danio rerio*, nota come “zebrafish”, seguendo la procedura OECD 236.

Il principio di tale metodo si basa sull'esposizione, a cinque concentrazioni del campione da analizzare, di singole uova di *zebrafish*, poste in piastre da 24 pozzetti per valutarne l'eventuale embriotossicità. Il test, deve iniziare entro 90 minuti dalla fecondazione delle uova. E' previsto l'allestimento anche di un controllo positivo per ogni gruppo di uova utilizzate impiegando, come tossico di riferimento, la 3,4-dicloroanilina (3,4 DCA) alla concentrazione unica di 4 mg/L. Le piastre multipozzetto, contenenti 20 uova per ciascuna concentrazione, vengono incubate a 26 ± 1°C con ciclo luce-buio per un periodo di 96 ore.

Eventuali malformazioni dell'embrione vengono registrate attraverso l'osservazione ogni 24 ore di quattro distinti *endpoint*: la coagulazione delle uova fecondate, la mancanza di formazione del somite, il mancato distacco della coda dal sacco vitellino e la mancanza di battito cardiaco.

Al termine del periodo di esposizione, la tossicità acuta viene determinata sulla base di un risultato positivo di una delle quattro osservazioni apicali registrate ed espressa come concentrazione letale mediana LC50.

Test di mutagenicità (MN-test)

Il test dei micronuclei (MN-test) è stato effettuato sugli apici radicali della specie vegetale *Vicia faba*, varietà minor. Questo test è in grado di misurare gli effetti mutageni che risultano dall'interazione degli inquinanti presenti in un ambiente a cui gli organismi sono esposti attraverso la formazione di micronuclei che conseguono al danno cromosomico indotto. Il test è stato condotto considerando le esposizioni delle radici al campione a 4, 24 e 72 ore. Come controllo negativo è stata utilizzata acqua distillata, mentre per il controllo positivo Idrazide maleica 10^{-4} M (4 h di trattamento + 68 h in acqua).

La frequenza dei micronuclei è stata ottenuta dall'analisi microscopica di due vetrini (5000 cellule x vetrino) per ogni tempo di esposizione, su un totale di 30.000 cellule x campione, analizzando 1000 cellule per radice, 10 radici per punto sperimentale (Gustavino et al., 2013).

Per evitare una sottostima della frequenza dei micronuclei a causa di un alterato tasso di proliferazione delle cellule, il MN-test è stato eseguito solo in apici radicali con un indice mitotico compreso tra 2 e 12%.

Risultati e Discussione

I risultati ottenuti con l'alga *Pseudokirchneriella subcapitata* evidenziano una elevata tossicità per i campioni C1, C2 e C3 (tabella 2) con valori di EC50 minori del 3%, il campione C4 è risultato meno tossico con EC50 uguale a 35%.

Per *Vibrio fischeri*, tre dei quattro campioni (C1, C2 e C4) presentano elevata tossicità con EC50 prossimi al 30%, mentre risulta non tossico il campione C3 (tabella 2).

Per *Daphnia magna* le percentuali di immobilizzazione ottenute non hanno permesso di calcolare le EC50; risultano non tossici i campioni C1 e C2, mentre i campioni C3 e C4 esibiscono una moderata tossicità, con valori 35% e 55% rispettivamente (tabella 3).

I risultati ottenuti con gli embrioni di *Danio rerio* sono riportati in percentuale di mortalità, dato che non è stata possibile l'estrapolazione della LC50. Il FET ha evidenziato la presenza di tossicità per C1 e C3, debole tossicità per il C4, mentre il campione C2 non è risultato tossico (tabella 3).

La frequenza dei micronuclei nelle cellule apicali di *Vicia faba* in ciascun campione in esame è risultato più elevato del controllo negativo ($p < 0,05$) (tabella 4).

Tabella 2. Risultati dei saggi ecotossicologici con l'alga Pseudokirchneriella subcapitata e con il batterio Vibrio fischeri

Campioni	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> EC50 % (72h)	<i>Vibrio fischeri</i> EC50 % (30min)
C 1	2,80	34,89
C 2	1,50	0
C 3	2,90	37,29
C 4	35,40	33,80

Tabella 3. Risultati dei saggi ecotossicologici con il crostaceo Daphnia magna e con gli embrioni del pesce Danio rerio

Campioni	<i>Daphnia magna</i> % immobilizzazione (48h)	<i>Danio rerio</i> % Mortalità (96h)
C 1	0	55
C 2	0	0
C 3	35	20
C 4	55	5

Tabella 4. Le frequenze dei micronuclei in Vicia faba a differenti tempi di esposizione

Campioni	Frequenza di MN		
	4 h	24 h	72 h
C 1	0,7	1,3*	1
C 2	4,1**	2,6**	1,3*
C 3	2,4***	0,9	1,3**
C 4	1,6*	3,2**	0,4
Controllo negativo		0,2	
Controllo positivo		131,6	

*=debolmente tossico; **=mediamente tossico ; ***=molto tossico

Da una prima analisi, si evince che le risposte ottenute per i test con *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* e il *Danio rerio*, sono concordi con il giudizio di non tossicità del campione C2, inoltre *Vibrio fischeri* e *Danio rerio* hanno evidenziato un trend di tossicità simile per i quattro campioni.

L'alga si è dimostrata l'organismo più sensibile, sebbene non si allinei con i risultati ottenuti con gli altri test, forse poiché unico test cronico presente nella batteria considerata.

Solamente il saggio con *Daphnia* non ha rilevato nessun effetto di tossicità per il campione C1.

Si sottolinea, infine, che il saggio dei micronuclei ha permesso di evidenziare per tutti i campioni, la presenza di un effetto genotossico, informazione importante per la corretta gestione dei rifiuti.

Conclusioni

I risultati emersi dall'utilizzo della batteria di test selezionata per la caratteristica H14 dei rifiuti, hanno evidenziato gli effetti di tossicità e i potenziali effetti mutageni dei campioni.

Il *Fish Embryo Acute Toxicity Test* con embrioni di *Danio rerio*, proposto in questo studio, si è dimostrato una valida alternativa al saggio acuto su pesci richiesto dalla normativa sui rifiuti, rispettando quanto indicato dalla direttiva Europea 2010/63/EU sulla protezione degli animali e dal *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals* (REACH), poiché i primi stadi embrionali non sono considerati fra le forme vitali protette. Il FET, pertanto, non necessita delle autorizzazioni specifiche per la sperimentazione animale. La sua esecuzione è risultata, inoltre, di facile e rapida applicazione prevedendo una minore quantità di campione da saggiare rispetto al corrispondente test su pesci adulti. L'utilizzo di tale test, come confermato dalla sperimentazione, può, pertanto, superare i diversi problemi sia pratici che operativi che l'uso del saggio acuto su pesci adulti comporta, fornendo comunque risultati significativi nella caratterizzazione dei rifiuti.

L'altro test proposto in questo studio, quello su *Vibrio fischeri*, si è dimostrato in linea con gli altri saggi, presentando, inoltre, vantaggi come l'ampia diffusione e utilizzo in campo ecotossicologico e la rapidità di esecuzione della prova.

Per completare e integrare le informazioni sulla pericolosità dei rifiuti è risultata valida anche la scelta di aggiungere un biomarker alla batteria; il test dei micronuclei su *Vicia faba*, infatti, ha permesso di rilevare la presenza di effetti mutageni dei campioni.

I primi risultati sperimentali per la batteria di test proposta, sembrano, pertanto, fornire concrete risposte tecnico-pratiche alle problematiche connesse alla caratterizzazione dei rifiuti per l'H14, restituendo, inoltre, importanti informazioni tali da poter essere trasferite anche nelle azioni di controllo e di monitoraggio.

Bibliografia

Italia, 2012. Decreto Legge 25 gennaio 2012, n. 2, Misure straordinarie e urgenti in materia ambientale. Come convertito in legge, dall'art. 1, comma 1, L. 24 marzo 2012, n. 28. Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.20 del 25-01-2012.

Italia, 2014. Decreto Legislativo 4 marzo 2014, n. 26. Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. Gazzetta Ufficiale Serie Generale n.61 del 14-03-2014.

Europa, 2010. Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea del 20-10-2010. L. 276/33.

Gustavino B, Caciolli S, Mancini L 2013. Linea guida del test dei micronuclei in *Vicia faba* per la valutazione di effetti mutageni in acque dolci e sedimenti. Rapporti ISTISAN 13/27.

OECD 2006. Guidelines for the testing of chemicals. Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. Guideline 201.

OECD 2004. Guidelines for the testing of chemicals. Daphnia sp., Acute Immobilization Test and Reproduction test. Guideline 202.

OECD 1992. Guidelines for the testing of chemicals. Fish, Acute Toxicity Test. Guideline 203.

OECD 2013. Guidelines for the testing of chemicals. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Guideline 236.

UNI EN 14735: 2005. Caratterizzazione dei rifiuti – Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche.

UNI EN ISO 11348-2: 2007. Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) Method using liquid-dried bacteria.