

TEST RICHIESTI PER LA CLASSIFICAZIONE ECOTOSSICOLOGICA

Silvia Marchini

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Aspetti normativi

La Direttiva 2008/98/CE sui rifiuti (1) definisce come H14 – Ecotossico un “rifiuto che presenta o può presentare rischi immediati o differiti per uno o più comparti ambientali”. La legge 28/2012 (2) stabilisce che, nelle more di una normativa specifica, la classificazione dei rifiuti per la caratteristica H14 sia condotta secondo quanto previsto dall’Accordo europeo relativo ai trasporti internazionali di merci pericolose su strada (ADR) (3). Tale accordo indica come appartenenti alla classe 9 (sostanze e articoli pericolosi diversi) le sostanze pericolose per l’ambiente, definite come sostanze liquide o solide inquinanti per l’ambiente acquatico e soluzioni e miscele di tali sostanze come preparati e rifiuti, come indicato nelle sottoclassi M6 ed M7.¹

Come illustrato in maggior dettaglio nei contributi precedenti, la classificazione di pericolo acuto e cronico delle sostanze e miscele per l’ambiente acquatico secondo l’ADR si basa in primo luogo sui dati di tossicità disponibili (nella versione aggiornata del 2013 non ci sono variazioni a riguardo). Per la classificazione di rischio cronico delle sostanze, questi ultimi sono supportati, laddove pertinenti, da informazioni sul bioaccumulo potenziale o misurato e sulla degradazione biotica e abiotica. A tale proposito va ricordato che per le sostanze inorganiche e metalli i criteri e misure di degradabilità e bioaccumulo indicati nell’ADR non sono applicabili, per le miscele in quanto tali (quali sono in genere i rifiuti) questi dati non possono essere determinati sperimentalmente, e per i rifiuti è probabile che tali informazioni non possano essere raccolte per tutti i componenti.

L’approccio sperimentale per l’identificazione di un rifiuto “ecotossico” nelle “voci specchio” è richiesto quando la sua composizione non è (sufficientemente) nota o non è possibile classificarlo sulla base delle informazioni disponibili per i singoli componenti, come può accadere nel caso di miscele complesse. A differenza di quanto stabilito per le sostanze, per la classificazione di pericolo cronico delle miscele non è prevista, in assenza di dati sperimentali, la possibilità di utilizzare dati di tossicità acuta sulle stesse (punto 2.2.9.1.10.4.3 dell’ADR), con evidenti e importanti implicazioni per la strategia sperimentale mirata alla classificazione dei rifiuti. Infatti, mentre la verifica della categoria di pericolo acuta (EC_{50} (*Effective Concentration*) o LC_{50} (*Lethal Concentration*) ≤ 1 mg/L per pesci o crostacei o alghe/piante) è sufficiente da sola per l’attribuzione della caratteristica H14, qualora la categoria acuta non sia assegnabile (> 1 mg/L o $>$ solubilità in acqua per tutti e tre gli organismi) il pericolo cronico (≤ 1 mg/L per pesci o crostacei o alghe/piante) non può essere escluso. Ne consegue che, per poter concludere su base sperimentale che un rifiuto saggiato *in toto* è “non ecotossico”, è necessario verificare che il criterio, più conservativo, per la categoria cronico (NOEC (*No Observed Effect Concentration*) o EC_x ($x\%$ *Effective Concentration*) > 1 mg/L o $>$ solubilità in acqua) sia superato per tutti e tre gli organismi.

¹ Nella traduzione italiana dell’ADR (versione non ufficiale del 2011 attualmente in rete) sono stati rilevati imprecisioni ed errori. Nel presente capitolo si fa perciò riferimento alla versione originale in inglese, mantenendo una terminologia coerente con altre normative correlate, quali per esempio CLP (4).

Con l'adozione della norma ADR viene pertanto a decadere, relativamente all'approccio sperimentale per la classificazione H14, quanto indicato nel precedente parere espresso congiuntamente da Istituto Superiore di Sanità (ISS) e Istituto Superiore per la Protezione Ambientale (ISPRA) (5), che prevedeva l'esecuzione di una batteria di test, comprendente il test con il batterio luminescente *Vibrio fischeri*, il test con alghe (*Pseudokirchneriella subcapitata*) e quello acuto con *Daphnia magna*, in cui gli organismi erano esposti a diluizioni seriali del campione e i risultati erano espressi in percentuale in funzione del rapporto di diluizione.

Test ecotossicologici

È generalmente riconosciuto che i test misurano l'effettiva tossicità di una miscela/rifiuto (inglobando le proprietà di persistenza e accumulo dei componenti), evitano falsi positivi (riflettendo gli effetti dovuti alla sola frazione biodisponibile), integrano le interazioni tra i suoi componenti e superano/limitano la necessità di misure analitiche. Gli studi ecotossicologici possono pertanto confutare la classificazione basata sulle analisi chimiche, come ad esempio mostrato per varie tipologie di ceneri la cui classificazione basata sul contenuto totale delle sostanze nelle matrici solide sovrastimava di gran lunga le risposte tossiche osservate con gli eluati (6).

Nei vari contesti regolatori e scientifici, c'è accordo nel riconoscere che poiché la tossicità di una sostanza (e tanto più di una miscela) è specie-specifica e non è possibile individuare il test od organismo "più sensibile", è necessario che la valutazione del pericolo ambientale si fondi su una batteria di test con organismi rappresentativi dei diversi livelli trofici (decompositori, produttori, consumatori primari e secondari) e delle diverse vie di esposizione. Va notato comunque che anche la specie "rappresentativa" non sempre si rivela quella più sensibile all'interno dello stesso gruppo tassonomico (7).

L'importanza di utilizzare test standardizzati, al fine di garantire la loro ripetibilità (variabilità intralaboratorio), riproducibilità (variabilità interlaboratorio) e precisione/accuratezza della risposta, è evidente specie in ambito regolatorio quale quello della classificazione. L'ADR dà preferenza a linee guida internazionali, quali quelle dell'*Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD o in lingua italiana OCSE, Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico) o equivalenti, ma prevede la possibilità di usare anche metodi nazionali, se equivalenti. Si fa presente che le linee guida OECD (*Test Guidelines*, TG) vengono periodicamente aggiornate per adeguarsi ai progressi scientifici e, per alcuni test, le versioni incluse nella parte C del Regolamento (CE) 440/2008 (8), alla quale fa riferimento il Regolamento CLP (4), sono superate. Le linee guida OECD sono disponibili all'indirizzo http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-2-effects-on-biotic-systems_20745761. Nel presente capitolo si fa riferimento principalmente a queste linee guida, ma per molti dei test citati sono disponibili altri metodi standardizzati (*International Organization for Standardization*, ISO; *American Standard Testing and Materials*, ASTM; *Environment Canada*).

Per la classificazione ambientale, l'ADR indica i pesci, i crostacei e le alghe/piante acquatiche come *taxa* rappresentativi degli organismi consumatori e produttori, e in generale della biocenosi acquatica, analogamente a quanto richiesto per la valutazione di rischio per l'ambiente acquatico delle sostanze e formulati (biocidi, pesticidi, ecc.). In tutti i casi, gli organismi decompositori non sono inclusi. È lasciata la possibilità di utilizzare dati su altri organismi se questi rappresentano specie ed *end-point* equivalenti, permettendo, di fatto, una certa flessibilità ma dando anche adito a diverse interpretazioni.

A ogni modo, la classificazione di pericolo secondo ADR comporta la messa a punto di opportune modifiche metodologiche per l'esecuzione dei test standard (tradizionali o "equivalenti") con i rifiuti, che tengano conto anche delle molteplici tipologie di rifiuto. Fasi critiche sono la procedura di preparazione del campione, dell'estratto acquoso/lisciviato (inclusa la scelta del medium) e del suo trattamento prima di sottoporlo ai test di ecotossicità. Da questi ultimi dipendono, infatti, la solubilità dei componenti del rifiuto (nel medium di prova e alle condizioni del test) e la loro biodisponibilità, in ultima analisi la tossicità del rifiuto e la sua classificazione.

I test tossicologici sono in genere condotti con una serie di concentrazioni (almeno 5) del materiale in esame ma, qualora interessi il superamento o meno di una soglia (come per la classificazione) possono essere condotti con una sola concentrazione corrispondente a quella soglia o al limite di solubilità in acqua del materiale in esame (test limite). La verifica analitica del mantenimento della concentrazione del materiale testato, richiesta dai test OECD, non è applicabile agli estratti di rifiuti, dove spesso i componenti sono numerosi e non noti. In questi casi è opportuno adottare misure tali da limitare il rischio di perdita di concentrazione, per esempio rinnovando le soluzioni e condizionando i contenitori di prova.

Nell'interpretazione dei risultati dei test occorre tener presente i possibili fattori confondenti di varia natura, che a causa della complessa composizione dei rifiuti possono essere molteplici e interferire con la misura della tossicità (es. presenza nel medium di agenti responsabili della chelazione dei metalli pesanti, diminuzione della concentrazione delle sostanze durante il test a causa di degradazione rapida o adsorbimento alle pareti dei contenitori, deriva del pH, livello di ossigeno disciolto, di ammoniaca e di sali, torbidità e colore dell'estratto o lisciviato, presenza di microrganismi, ecc.).

Test di tossicità acuta

I test di tossicità acuta misurano gli effetti severi (spesso letali) prodotti dalle sostanze chimiche a seguito ad una esposizione di breve durata (in genere 2-7 giorni). Va sottolineato che "breve durata" è da intendersi in relazione alla lunghezza del ciclo vitale dell'organismo, pertanto anche test di poche ore o giorni possono fornire informazioni di tossicità cronica su organismi a ciclo vitale breve. I risultati dei test acuti sono espressi come concentrazione alla quale gli effetti sono misurati sul 50% degli individui esposti (es. LC_{50} per mortalità nei pesci, EC_{50} per immobilizzazione nella *Daphnia*) o alla quale una risposta è ridotta al 50% rispetto al controllo (es. E_rC_{50} nel caso di inibizione della crescita nelle alghe). Statisticamente, la LC_{50} e EC_{50} rappresentano la mediana della distribuzione (normale) della sensibilità della specie. Statisticamente, la LC_{50} o EC_{50} rappresentano statisticamente la mediana della distribuzione (normale) della sensibilità della specie.

I test dell'OECD su pesci, crostacei, alghe e piante indicati nell'ADR sono descritti sinteticamente nelle Tabelle 1-4; si rimanda alle linee guida originali per il testo completo. Il test algale OECD TG 201 (Tabella 3), revisionato nel 2011 per modifiche sulla analisi statistica non lineare, è un test a breve termine ma multigenerazionale e pertanto fornisce *end-point* di tossicità cronica. Generalmente, la EC_{50} viene utilizzata per esprimere la tossicità acuta e la $NOEC/EC_{10}$ per quella cronica (8, 11). L'EC è derivata da analisi di regressione lineare (modificata per dati continui) o non lineare, che gestisce meglio le irregolarità alle percentuali di effetto basse. Nella derivazione dell'EC è raccomandato che il calcolo e utilizzo dell'*end-point* basato sul tasso di crescita (E_rC_{50} o NOE_rC) piuttosto che di quello basato sull'incremento di biomassa (E_bC_{50} o NOE_yC), in quanto, pur fornendo in genere un valore più alto (meno conservativo) del secondo è considerato scientificamente più affidabile in quanto indipendente dal disegno sperimentale (12).

Tabella 1. OECD TG 203/C1: pesci, test di tossicità acuta (8, 9)

Parametro	specifica
Specie	<i>Pimephales promelas</i> ; <i>Cyprinus carpio</i> ; <i>Oryzias latipes</i> ; <i>Poecilia reticulata</i> ; <i>Lepomis macrochirus</i> ; <i>Oncorhynchus mykiss</i> .
Organismi	lunghezza 2-5 cm \pm 1 (a seconda della specie)
Durata	96 ore
Procedura	statica/semistatica/flusso continuo
Numero organismi	≥ 7 /concentrazione
Repliche	non specificate
Volume soluzione	1 g pesce/L (in regime statico/semistatico)
Temperatura	a seconda della specie mantenuta entro $\pm 2^\circ\text{C}$
pH	6-8.5 (mantenuto entro 1.5 unità)
Durezza acqua	10-250 mg CaCO_3 /L
Fotoperiodo	12-16 ore luce
Alimentazione	nessuna
Misura	mortalità
<i>End-point</i>	96 h LC_{50}
Osservazioni	anormalità visibili
Criteri di validità	$\leq 10\%$ individui morti nel controllo; O_2 disciolto $\geq 60\%$ mg/L in tutte le concentrazioni

Tabella 2. OECD TG 202/C2: *Daphnia* sp., test acuto di immobilizzazione (8, 10)

Parametro	specifica
Specie	<i>Daphnia</i> sp.
Organismi	neonati < 24 ore
Durata	48 ore
Procedura	statica/semistatica
Numero organismi	20/concentrazione
Repliche	4
Volume soluzione	minimo 10 mL/replica
Temperatura	$20 \pm 2^\circ\text{C}$ (mantenuta entro $\pm 1^\circ\text{C}$)
pH	6-9 (mantenuto entro 1,5 unità)
Durezza acqua	140-250 mg CaCO_3 /L
Fotoperiodo:	16 ore luce (se necessario al buio)
Alimentazione	alghe
Misura	immobilizzazione
<i>End-point</i>	48 h EC_{50}
Osservazioni	colore, intrappolamento alla superficie dell'acqua
Criteri di validità	$\leq 10\%$ individui immobili, sbiaditi o intrappolati nel controllo; O_2 disciolto ≥ 3 mg/L in tutte le concentrazioni

Tabella 3. OECD TG 201: alghe e cianobatteri di acqua dolce, test di inibizione della crescita (13)

Parametro	specifica
Specie	alghe verdi: <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> , <i>Desmodesmus subspicatus</i> (anche diatomee e cianobatteri)
Organismi	colture in crescita esponenziale
Durata	72 ± 24 ore
Procedura	Statica
Numero organismi	5 x 10 ³ - 10 ⁴ cellule/mL (<i>P. subcapitata</i>), 2-5 x 10 ³ cellule/mL (<i>D. subspicatus</i>)
Repliche:	3 (per il controllo preferibile 6)
Medium	sintetico: US EPA (pH 7.5) o OECD* (pH 8.1)
Volume del mezzo	adeguato per scambio gassoso (ottenuto con agitazione/scuotimento)
Temperatura	21-24 ± 2 °C
pH	aumenti fino a ± 1,5 unità nel controllo (inferiore per metalli e composti ionizzabili)
Fotoperiodo	luce continua
Illuminazione	4500-9000 lux
Misura	numero di cellule (mediante conta, fluorescenza)
Risposta	riduzione del tasso specifico di crescita (r) rispetto al controllo; (aggiuntionale: riduzione dell'incremento in biomassa (y) rispetto al controllo)
End-point	E _r C ₅₀ (e E _y C ₅₀) per la tossicità acuta; NOE _r C/EC _x (e NOE _y C/E _y C _x) per la tossicità cronica
Osservazioni	anormalità delle cellule
Criteri di validità	Aumento della concentrazione cellulare nel controllo in 72 ore: 16 volte; Coefficiente di variazione dei tassi di crescita specifici medi nelle repliche del controllo: <7%; Coefficiente di variazione medio dei tassi di crescita calcolati per ogni giorno nelle repliche del controllo: <35%

* Rapporto molare EDTA/Fe tale da prevenire la precipitazione del ferro e minimizzare la chelazione dei metalli pesanti

Tabella 4. OECD TG 221/C20: *Lemna* sp., test di inibizione della crescita (8, 15,)

Parametro	specifica
Specie	<i>Lemna minor</i> , <i>Lemna gibba</i>
Organismi	Piante con 2-4 fronde
Durata	7 giorni
Procedura	Statica, semi-statica, flusso continuo
Numero organismi	9-12 fronde
Repliche:	3 (per il controllo preferibile 6)
Medium	SIS per <i>L. minor</i> , 20X AAP per <i>L. gibba</i> , Steinberg medium per ambedue
Volume del mezzo	100 mL, profondità minima 2 cm
Temperatura	24 ± 2 °C
pH	A seconda del mezzo di coltura. Aumenti fino a ± 1,5 unità nel controllo (inferiore per metalli e composti ionizzabili)
Fotoperiodo:	luce continua
Illuminazione	6500-10000 lux
Misura	numero di fronde e area totale delle fronde o peso
Risposta	riduzione del tasso specifico di crescita rispetto al controllo (r); aggiuntionale: riduzione dell'incremento in biomassa (y)
End-point	ErCx (e EyCx); NOEC (opzionale)
Osservazioni	Variazioni nello sviluppo delle piante
Criteri di validità	Incremento n° fronde di 7 volte (tasso di crescita specifico = 0,275/giorno)

Si fa osservare che l'estensione della durata del test a 96 ore non fornisce necessariamente una risposta più severa di quella misurata a 72 ore, anzi non è raro osservare un recupero della popolazione algale e quindi effetti meno marcati. L'ADR prevede che, qualora la metodologia sperimentale sia adatta, i dati su piante acquatiche (quali *Lemna* sp.) possano essere presi in considerazione in alternativa a quelli sulle alghe (vedi Tabella 4).

Lemna, sebbene sia una fanerogama, si propaga in maniera vegetativa, accrescendosi dal centro meristemico. Il ciclo riproduttivo è rapido, pertanto il test a 7 giorni fornisce risposte di tipo cronico ma, analogamente all'approccio seguito per le alghe, l'EC₅₀ è in genere utilizzato come *end-point* di tossicità acuta (14).

Poiché *Lemna* galleggia sulla superficie dell'acqua, il test rappresenta una alternativa a quello algale nei casi di estratti torbidi/colorati, dove la riduzione della luce interferirebbe con la fotosintesi.

Test di tossicità cronica

I test cronici consentono di determinare gli effetti avversi letali e in particolare quelli subletali (es. inibizione della crescita o riproduzione) delle sostanze chimiche e loro prodotti di degradazione, conseguenti un'esposizione prolungata, che copre gran parte del ciclo vitale di un organismo o anche più generazioni, a concentrazioni più basse di quelle che causano effetti letali nei test acuti.

La limitazione dell'esposizione ai soli stadi vitali più sensibili consente di ridurre notevolmente i tempi di esecuzione dei test cronici e i relativi costi, mantenendone al contempo la sensibilità e capacità discriminativa.

Un buon esempio è il test OECD TG 210 (16) sugli stadi di vita precoci dei pesci, che inizia con le uova appena fertilizzate e termina dopo che le larve si sono alimentate da fonte esogena per un certo periodo. Il test, pur essendo un test sub-cronico, è in grado di predire la tossicità cronica e pertanto è comunemente utilizzato nella valutazione del rischio e nella classificazione (incluso l'ADR).

La tossicità cronica è tradizionalmente espressa come la concentrazione più elevata alla quale non sono osservati effetti statisticamente diversi dal controllo (NOEC); a questo *end-point* si è andato nel tempo affiancando/sostituendo un *end-point* derivato da metodi statistici di regressione (EC_x) che rappresenta la concentrazione alla quale si osservano effetti su un percentile x degli organismi esposti o della risposta misurata (es. inibizione della crescita).

La scelta del percentile per i vari gruppi di organismi (tale da rendere EC_x equivalente al NOEC) è in discussione in vari forum e deve tener conto, tra l'altro, anche della differenza tra significato statistico e significato biologico di un effetto. In genere è utilizzato EC₁₀ (11, 17).

La maggiore appropriatezza di esprimere i risultati di un test come NOEC o EC_x è determinata dal disegno sperimentale (numero di repliche e di concentrazioni).

I test di tossicità cronica OECD su pesci e *Daphnia magna* menzionati nell'ADR sono brevemente illustrati nelle Tabelle 5 e 6, mentre quelli sulle alghe e piante sono gli stessi già descritti sopra (vedi Tabelle 3 e 4). Si rimanda alle linee guida originali per il testo completo.

Ai fini della classificazione dei rifiuti i test cronici sopra descritti appaiono di difficile applicazione principalmente a causa della lunga durata, dei volumi di estratto acquoso necessari e dei ripetuti rinnovi richiesti dalla procedura semistatica.

Per il test con pesci, ulteriori ostacoli sono rappresentati dalla complessità di esecuzione e dalla necessità di autorizzazioni per l'uso di animali vertebrati.

Tabella 5. OECD TG 210: pesci, test di tossicità sugli stadi di vita precoci (16)

Parametro	specifica
Specie	<i>Pimephales promelas</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Danio rerio</i> , <i>Oryzias latipes</i> / <i>Cyprinodon variegatus</i> , <i>Menidia sp.</i>
Organismi	uova prima dello stadio di gastrula
Durata	28-60 gg dopo la schiusa (30 gg per <i>D. rerio</i>)
Procedura	semistatica/flusso continuo
Numero organismi	80 uova/concentrazione
Repliche	4
Medium	adeguato per la sopravvivenza e crescita dei pesci
Contenitori	volume adeguato (7 l per pesci piccoli)
Volume soluzione	g pesce/L sufficiente per mantenere $\geq 60\%$ O ₂
Temperatura	appropriata per la specie ($26 \pm 1,5$ °C per <i>D. rerio</i>)
Fotoperiodo	appropriato per la specie (12-16 ore luce per <i>D. rerio</i>)
Alimentazione	secondo la specie (dal 2° giorno dopo la schiusa per <i>D. rerio</i>)
Misura	mortalità, schiusa, anormalità, comportamento, peso, lunghezza
End-point	30/60gg NOEC/ECx
Criteri di validità	Ossigeno disciolto $>60\%$ della saturazione; temperatura mantenuta entro $\pm 1,5$ °C; mantenimento delle concentrazioni nelle soluzioni durante il test; nel controllo, sopravvivenza delle uova e delle larve nei limiti stabiliti per la specie ($>70\%$ e $>75\%$ rispettivamente per <i>D. rerio</i>).

Tabella 6. OECD TG 211: *Daphnia magna*, test di riproduzione (18)*

Parametro	specifica
Specie	<i>Daphnia magna</i>
Organismi	piccoli < 24 ore
Durata	21 gg
Procedura	Semistatica
Numero organismi	20/concentrazione
Repliche	4
Medium	M4, M7 o altri adeguati adeguato per la sopravvivenza e riproduzione
pH	6-9
Volume soluzione	50 mL
Temperatura	20 ± 2 °C
Fotoperiodo	16 ore luce
Alimentazione	alghe unicellulari (0,1-0,2 mg C/ <i>Daphnia</i> /g)
Misura	mortalità delle madri, numero di piccoli (lunghezza)
End-point	21 gg EC _x /NOEC
Criteri di validità	Nel controllo: mortalità delle femmine iniziali $\leq 20\%$; numero medio di piccolo vivi/femmina sopravvissuta alla fine del test > 60 . In tutte le concentrazioni: mortalità accidentale delle femmine $\leq 20\%$.

* revisione 2012 (recante aggiornamenti su analisi dei dati, disegno sperimentale, trattamento dei risultati, introduzione di un test limite).

Altri test “equivalenti”²

La normativa comunitaria ha adottato il principio di sostituzione, riduzione e miglioramento della sperimentazione su animali vertebrati, incoraggiando l'uso di metodi alternativi, come esplicitato nel considerando 47 del Regolamento (CE) 1907/2006 (noto come REACH dall'inglese *Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals*) (17). A questo scopo sono stati messi a punto test acuti e cronici con embrione di pesce, che non rientra nella definizione di “animale” secondo la Direttiva 2010/63/UE (19), in quanto, benché si protraggano anche dopo la schiusa delle uova, terminano prima che la larva abbia raggiunto lo stadio in cui si nutre autonomamente.

Il test OECD TG 236 (20) misura la tossicità acuta sugli stadi embrionali del pesce *Danio rerio*, a partire dalle uova allo stadio di 16 cellule al massimo. Dopo una pre-esposizione, durante la quale si selezionano le uova fecondate, queste sono trasferite (entro 3 ore dalla fecondazione) nei pozzetti previamente condizionati con la soluzione in esame, che viene rinnovata a intervalli regolari. Gli effetti misurati come indicatori di mortalità sono: coagulazione, mancata formazione di somiti, mancato distacco della coda, mancanza di battito cardiaco, espressi come 96 ore LC₅₀. La durata del test consente l'esposizione anche degli stadi larvali iniziali. Un attributo importante di questo test *in vitro* è quello di utilizzare un sistema biologico complesso, anche se la capacità metabolica dell'organismo non è ancora completa e il corion potrebbe rappresentare una barriera alla biosponibilità delle sostanze chimiche.

Un test di tossicità “cronica” a breve termine sui pesci è OECD TG 212 (21), che inizia con le uova appena fertilizzate e termina alla fine dello stadio larvale di nutrizione endogena. Il test è condotto in regime semistatico o flusso continuo ed ha una durata di 8-10 giorni per *Danio rerio* (più lunga per altre specie). Sono misurati effetti letali (schiusa, sopravvivenza degli embrioni e larve) e subletali (lunghezza, aspetto e comportamento anormale delle larve), espressi come NOEC o LC/EC_x. Rispetto al test OECD TG 210 (16), questo test ha una durata sensibilmente inferiore, con conseguente riduzione di costi, ma potrebbe sottostimare la tossicità di sostanze molto lipofile (per il mancato raggiungimento dell'equilibrio tra le fasi pesce/acqua) e con modo d'azione specifico (per il mancato manifestarsi di effetti ritardati).

Pur superando il problema etico e quello di disporre di grandi volumi di estratto acquoso, non si possono comunque sottovalutare le difficoltà pratico-logistiche poste dai suddetti test, se applicati ai rifiuti, relative alla necessità di allestire vasche per il mantenimento e riproduzione di pesci e di assicurare competenze tecniche specifiche degli operatori.

Promettenti sono i modelli *in vitro* basati su cellule primarie (es. branchiali) o linee cellulari di pesce, che oltre a ridurre o eliminare l'uso di animali, consentono di indagare i meccanismi di tossicità a livello cellulare. L'utilizzo di questi modelli, come strumento rapido ed economico di valutazione ecotossicologica alternativo ai test tradizionali, è ancora oggetto di studio al fine di definirne la capacità predittiva degli effetti *in vivo*.

Il test con il batterio marino luminescente *Vibrio fischeri* (22), per la sua rapidità e possibilità di automatizzazione, è largamente utilizzato nelle indagini ambientali. Dopo un'esposizione di 30 minuti alla soluzione in esame, gli effetti tossici acuti sui batteri sono misurati in termini di inibizione dell'emissione di bioluminescenza ed espressi come EC₅₀. Il test era incluso nella batteria di base, insieme con quello su alghe unicellulari e *Daphnia magna*, oggetto del ring test europeo organizzato dall'Agenzia ambientale federale tedesca (23) condotto su lisciviati di tre matrici di rifiuto (ceneri, suolo e rifiuti legnosi) e, anche in base ai risultati ottenuti, gli stessi test acquatici erano stati raccomandati a livello comunitario come

² I test citati e relativi metodi sono da considerarsi esemplificativi e pertanto non rappresentano una lista esaustiva o raccomandata.

batteria minima per la caratterizzazione ecotossicologica dei rifiuti (24). Anche se il test con batteri luminescenti come sostituto di quello con pesci richiede un'approfondita discussione su tavoli internazionali, si ritiene che possa comunque rimanere un valido candidato come test di screening nella strategia sperimentale, in considerazione delle esperienze maturate e del buon livello di validazione.

Per i crostacei, una conveniente alternativa al test di riproduzione con *Daphnia magna* è rappresentata dal test di riproduzione con *Ceriodaphnia dubia* (25), un altro cladocero che, avendo un ciclo vitale più breve, fornisce analoghe informazioni in soli 7 giorni e, per le sue minori dimensioni, necessita di un volume di soluzione minore. Il test è stato applicato con successo ai lisciviati di rifiuti, rivelando talvolta anche una sensibilità maggiore di quello con *Daphnia magna* (25), ed è stato utilizzato come test addizionale nel succitato ring test europeo con i rifiuti, anche se il numero limitato di prove non ha consentito un'analisi conclusiva (26).

Uno studio statistico francese (27) ha analizzato i risultati di una batteria di due test su fase solida (*L. sativa*: 14 giorni; *E. fetida*: 14 giorni) e quattro test su estratto acquoso (*Daphnia magna*: 48 ore; *Ceriodaphnia dubia*: 7 giorni; *Pseudokirchneriella subcapitata*: 72 ore; *Vibrio fischeri*: 30 min), condotti su numerose tipologie di rifiuto, al fine di valutarne l'adeguatezza per l'attribuzione della proprietà H14. Lo studio ha concluso che la batteria poteva essere ottimizzata riducendola ai test con *V. fischeri*, *C. dubia*, *L. sativa*.

Nel caso di campioni con alta conducibilità, l'uso di organismi marini o eurialini è più appropriato poiché possono sopportare salinità elevate che sarebbero letali alle specie di acqua dolce. Per i crostacei copepodi è disponibile un metodo ISO per il test di tossicità acuta a 48 ore (28), mentre per la tossicità cronica è di prossima adozione un documento guida OECD (29) su un copepode arpacticoide, che ha però una durata eccessiva (36 giorni) per essere applicato alla caratterizzazione dei rifiuti e inoltre il metodo ha rivelato problemi di standardizzazione. Promettenti per l'applicazione ai rifiuti sono i test (sub)cronici condotti su stadi larvali in grado di misurare in sei giorni gli effetti sullo sviluppo delle larve e sopravvivenza dell'arpacticoide *Nitocra spinipes* (6) o in sette giorni l'immobilizzazione dei nauplii, in tutti i suoi stadi, del calanoide *Acartia tonsa* (30, 31).

Un consumatore primario (non crostaceo) che merita considerazione come modello sperimentale è il rotifero di acqua dolce *Brachionus calyciflorus*, organismo microscopico ubiquitario con un sistema metabolico complesso e una buona risposta alle sostanze chimiche. La rapida riproduzione partenogenetica consente l'esecuzione di un test di inibizione della crescita di popolazione, che copre almeno tre cicli riproduttivi in sole 48 ore e con volumi di estratto ridotti (32).

Anche per quanto riguarda i rifiuti, le evidenze sperimentali con ceneri di varia origine e invecchiamento confermano che i test (sub)cronici forniscono risposte più sensibili di quelli acuti (6).

Considerazioni conclusive

L'approccio sperimentale alla classificazione di pericolo per l'ambiente acquatico indicato nell'ADR presenta difficoltà applicative se adottato per la caratterizzazione dei rifiuti e richiede adattamenti e modifiche.

In primo luogo deve essere affrontato il problema posto dalla sperimentazione con i pesci. Gli aspetti etici sono superabili con l'uso di stadi vitali non protetti, ma rimangono punti aperti il trasferimento della metodologia a matrici complesse quali estratti di rifiuti e gli ostacoli di ordine pratico discussi sopra. Rimane da vagliare la possibilità di sostituzione dei test con pesci con altri modelli/metodi alternativi.

Per la classificazione di pericolo cronico dei rifiuti è importante disporre di strumenti agili, con buona capacità predittiva e ragionevolmente praticabili sul territorio nazionale. Possibili candidati alla sostituzione dei test cronici convenzionali indicati nell'ADR sono i test (sub)cronici a breve termine che, utilizzando specie a ciclo vitale breve e/o stadi vitali precoci maggiormente suscettibili alle sostanze chimiche, sono in grado di misurare effetti letali e subletali in un arco di tempo ridotto, con conseguente riduzione di costi. Bisogna comunque aver presente che la riduzione dei tempi di esposizione potrebbe sottostimare la tossicità dei prodotti di degradazione che si formano più lentamente e delle sostanze bioaccumulabili. È fondamentale che siano messe a punto nuove procedure condivise di preparazione del campione da sottoporre ai test ecotossicologici e siano fornite raccomandazioni sull'adozione di misure volte a prevenire, prima e durante il test, la perdita delle sostanze in soluzione e l'insorgere di condizioni che possono inficiarne i risultati. È inoltre necessario ampliare le esperienze specifiche di applicabilità dei test, tradizionali e non, a varie tipologie di rifiuto al fine di implementare il necessario processo di validazione.

Bibliografia

1. Europe. European Commission Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the Council of 19 November 2008 on waste and repealing certain Directives. *Official Journal of the European Union* L 312/3, 22 November 2008.
2. Italia. Legge 24 marzo 2012, n. 28. Conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 25 gennaio 2012, n. 2, recante misure straordinarie e urgenti in materia ambientale. *Gazzetta Ufficiale* n. 71, 24 marzo 2012.
3. United Nations Economic Commission for Europe – Committee on Inland Transport. ADR. *European Agreement concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Road. ECE/TRANS/215 (vol. I)*. New York, Geneva: United Nations, 2010.
4. Europa. Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 353, 31 dicembre 2008.
5. Istituto Superiore di Sanità, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale. *Parere ISPRA/ISS sulla classificazione dei rifiuti ai fini dell'attribuzione della caratteristica di pericolo H14 "Ecotossico"*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011. (Prot. n. 40832 del 29/09/2011). Disponibile all'indirizzo: http://www.iss.it/binary/ampp/cont/Ecotx_rf.pdf; ultima consultazione 15/12/14.
6. Stiernström S, Hemström K, Wik O, Carlsson G, Bengtsson, B-E, Breitholtz M. An ecotoxicological approach for hazard identification of energy ash. *Waste Management* 2011;(31(2):342-352.
7. EFSA. Opinion of the scientific panel on plant health, plant protection products and their residues on a request from EFSA related to the assessment of the acute and chronic risk to aquatic organisms with regard to the possibility of lowering the uncertainty factor if additional species were tested. (question no. EFSA-Q-2005-042). Adopted on 14 December 2005. *EFSA Journal* 2005;301:1-45.
8. Europa. Regolamento 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). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 142, 31 maggio 2008.
9. Organisation for Economic Co-operation and Development. *OECD 203. Fish, Acute Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. Paris: OECD Publishing; 1992.

10. Organisation for Economic Co-operation and Development. *OECD 202. Daphnia sp. Acute Immobilisation Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. Paris: OECD Publishing; 2004.
11. European Chemicals Agency. *Guidance on the application of the CLP criteria. Guidance to Regulation (EC) No 1272/2008 on classification, labelling and packaging (CLP) of substances and mixtures. Version 4.0*. Helsinki, Finland: ECHA; 2013.
12. European Chemicals Agency. *Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.7b: Endpoint specific guidance*. Version 1.1. Helsinki, Finland: ECHA; 2008.
13. OECD 201. *Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing; 2011.
14. Unione Europea. Regolamento n. 286/2011 della Commissione del 10 marzo 2011 recante modifica, ai fini dell'adeguamento al progresso tecnico e scientifico, del regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 83, 30 marzo 2011.
15. Organisation for Economic Co-operation and Development. *OECD 221. Lemna sp. Growth Inhibition Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. Paris: OECD Publishing; 2006.
16. Organisation for Economic Co-operation and Development. *OECD 210. Fish, Early-Life Stage Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. Paris: OECD Publishing; 1992.
17. Commissione Europea. 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 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE della Commissione. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 136, 29 maggio 2007.
18. Organisation for Economic Co-operation and Development. *OECD 211. Daphnia magna Reproduction Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. Paris: OECD Publishing; 2012.
19. Unione Europea. Direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali adottati ad usi scientifici. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 276, 20 ottobre 2010.
20. Organisation for Economic Co-operation and Development. *OECD 236. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. Paris: OECD Publishing; 2013.
21. Organisation for Economic Co-operation and Development. *OECD 212. Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: OECD Publishing; 1998.
22. UNI EN ISO 11348. *Qualità dell'acqua: Determinazione dell'effetto inibitorio di campioni acquosi sull'emissione di luce di Vibrio fischeri (prova su batteri luminescenti). Parte 1: Metodo con batteri preparati di fresco. Parte 2: Metodo con batteri gelificati. Parte 3: Metodo con batteri liofilizzati*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2001.
23. Moser H, Römbke J (Ed.). *Ecotoxicological characterization of waste - results and experiences of an international ring test*. New York: Springer; 2009.
24. European Committee for standardization. *Characterization of waste. Guidance on the use of ecotoxicity tests applied to waste*. Brussels: CEN; 2010. (Technical report ONR CEN/TR 16110).

25. Ferrari B, Radetski MC, Veber AM, Ferard JF. Ecotoxicological assessment of solid wastes: a combined liquid- and solid-phase testing approach using a battery of bioassays and biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1999;18(6):1195-202.
26. Moser H, Roembke J, Donnevert G, Becker R. Evaluation of biological methods for a future methodological implementation of the Hazard criterion H14 'ecotoxic' in the European waste list (2000/532/EC). *Waste Management & Research* 2011;29(2):180-7.
27. Pandard P, Devillers J, Charissou AM, Poulsen V, Jourdain MJ, Férard J-F, Grand C, Bispo A. Selecting a Battery of Bioassays for Ecotoxicological Characterization of Wastes. *Science of the Total Environment* 2006;363(1-3):114-125.
28. ISO 14669. *Water quality - Determination of acute lethal toxicity to marine copepods(Copepoda, Crustacea)*. Geneva: International Organization for Standardization; 1999.
29. OECD. *New guidance document on Harpacticoid Copepod development and reproduction test with Amphiascus. Series on Testing and Assessment No. 201*. Paris: OECD Publishing; 2014. (ENV/JM/MONO(2014)17)
30. UNICHIM Pr M.U. 2366. *Qualità dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della mobilità di naupli di Acartia tonsa Dana (Crustacea: Copepoda) dopo 7 giorni di esposizione*. Milano: Associazione per l'Unificazione nel Settore dell'Industria Chimica; 2010.
31. Gorbi G, Invidia M, Savorelli F, Faraponova O, Giacco E, Cigar M, Buttino I, Leoni T, Prato E, Lacchetti I, Sei S. Standardized methods for acute and semichronic toxicity tests with the copepod *Acartia tonsa*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2012;31:2023-8.
32. ISO 20666. *Water quality - Determination of the chronic toxicity to Brachionus calyciflorus in 48 h*. Geneva: International Organization for Standardization; 2008.