Il presente testo è un semplice strumento di documentazione e non produce alcun effetto giuridico. Le istituzioni dell'Unione non assumono alcuna responsabilità per i suoi contenuti. Le versioni facenti fede degli atti pertinenti, compresi i loro preamboli, sono quelle pubblicate nella Gazzetta ufficiale dell'Unione europea e disponibili in EUR-Lex. Tali testi ufficiali sono direttamente accessibili attraverso i link inseriti nel presente documento

►**B**

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)

(Testo rilevante ai fini del SEE)

(GU L 142 del 31.5.2008, pag. 1)

Modificato da:

		Gazzetta ufficiale		
		n.	pag.	data
►**M1**	Regolamento (CE) n. 761/2009 della Commissione del 23 luglio 2009	L 220	1	24.8.2009
►**M2**	Regolamento (UE) n. 1152/2010 della Commissione dell'8 dicembre 2010	L 324	13	9.12.2010
►**M3**	Regolamento (UE) n. 640/2012 della Commissione del 6 luglio 2012	L 193	1	20.7.2012
►**M4**	Regolamento (UE) n. 260/2014 della Commissione del 24 gennaio 2014	L 81	1	19.3.2014
►**M5**	Regolamento (UE) n. 900/2014 della Commissione del 15 luglio 2014	L 247	1	21.8.2014
►**M6**	Regolamento (UE) 2016/266 della Commissione del 7 dicembre 2015	L 54	1	1.3.2016
►**M7**	Regolamento (UE) 2017/735 della Commissione del 14 febbraio 2017	L 112	1	28.4.2017
►**M8**	Regolamento (UE) 2019/1390 della Commissione del 31 luglio 2019	L 247	1	26.9.2019
►**M9**	Regolamento (UE) 2023/464 della Commissione del 3 marzo 2023	L 68	37	6.3.2023
►**M10**	Regolamento (UE) 2024/2492 della Commissione del 23 settembre 2024	L 2492	1	24.9.2024
►**M11**	Regolamento (UE) 2025/2573 della Commissione del 18 dicembre 2025	L 2573	1	19.12.2025

Rettificato da:

►**C1** Rettifica, GU L 11 del 16.1.2014, pag. 12 (440/2008)

▼B

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)

(Testo rilevante ai fini del SEE)

Articolo 1

I metodi di prova applicabili ai fini del regolamento (CE) n. 1907/2006 sono definiti nell'allegato al presente regolamento.

Articolo 2

La Commissione riesamina, ove opportuno, i metodi di prova contenuti nel presente regolamento al fine di sostituire, ridurre o raffinare i test sugli animali vertebrati.

Articolo 3

I riferimenti all'allegato V della direttiva 67/548/CEE si intendono fatti al presente regolamento.

Articolo 4

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

Esso si applica a decorrere dal 1º giugno 2008.

▼B

ALLEGATO

▼M6

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.

▼M9

PARTE 0

METODI DI PROVA INTERNAZIONALI RICONOSCIUTI IDONEI PER ACQUISIRE INFORMAZIONI SULLE PROPRIETÀ INTRINSECHE DELLE SOSTANZE AI FINI DEL REGOLAMENTO (CE) n. 1907/2006

▼M10

TABELLA 1: METODI DI PROVA PER LE PROPRIETÀ FISICO-CHIMICHE DELLA SOSTANZA

Proprietà chimico-fisiche di base		
Endpoint	Metodo di prova	Capitolo corrispondente, che contiene la descrizione completa del metodo di prova, nella parte A del presente allegato (i riferimenti tra parentesi indicano che un metodo di prova è stato soppresso dalla parte A; casella vuota: nella parte A del presente allegato non figura nessun metodo di prova corrispondente)
Punto di fusione/punto di congelamento	OECD Test Guideline 102: Melting Point/Melting Range (1995)	A.1.
	ASTM D4359-90: Standard Test Method for Determining whether a Material Is a Liquid or a Solid	
	Test for determining fluidity according to section 2.3.4 of Annex A of the Agreement concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Road (ADR)	
Punto di ebollizione	OECD Test Guideline 103: Boiling point (1995)	A.2.
	Test methods according to table 2.6.4 of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
Infiammabilità	EN 15188:2020 – Determination of the spontaneous ignition behaviour of dust accumulations	
Limite inferiore e superiore di esplosività	Test methods according to section 2.2.4.1. of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008 (ISO 10156 and EN 1839)	
Punto di infiammabilità	Test methods according to table 2.6.3 of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	

▼**M10**

Proprietà chimico-fisiche di base		
Endpoint	Metodo di prova	Capitolo corrispondente, che contiene la descrizione completa del metodo di prova, nella parte A del presente allegato (i riferimenti tra parentesi indicano che un metodo di prova è stato soppresso dalla parte A; casella vuota: nella parte A del presente allegato non figura nessun metodo di prova corrispondente)
Temperatura di autoaccensione (liquidi, gas)	ISO/IEC 80079-20-1:2017 – Explosive atmospheres - Part 20-1: Material characteristics for gas and vapour classification - Test methods and data	
Temperatura di decomposizione	Calorimetric test methods according to section 20.3.3.3 of Part II of the UN Manual of Tests and Criteria	
	Test Series H, part II, section 28, of the UN Manual of Tests and Criteria for the self-accelerating decomposition temperature (SADT) (with reference to a specific package)	
pH	OECD Test Guideline 122: Determination of pH, Acidity and Alkalinity (2013)	
Viscosità cinematica	OECD Test Guideline 114: Viscosity of Liquids (2012)	
Idrosolubilità	OECD Test Guideline 105: Water Solubility (1995)	A.6.
Coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua	OECD Test Guideline 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake-Flask Method (1995)	(A.8.)
	OECD Test Guideline 123: Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method (2022)	A.23.
	OECD Test Guideline 117: Partition Coefficient (n-octanol/water): HPLC Method (2022)	A.24.
Tensione di vapore	OECD Test Guideline 104: Vapour Pressure (2006)	(A.4)
Densità/densità relativa	OECD Test Guideline 109: Density of Liquids and Solids (2012)	(A.3.)
	DIN 66137-2 - Determination of solid state density - Part 2: Gas pycnometry	
	ISO 12154 - Determination of density by volumetric displacement - Skeleton density by gas pycnometry	
Caratteristiche delle particelle	EU test method A.22. Length Weighted Geometric Mean Diameter of Fibres	A.22.
	ISO 21501 - Determination of Particle Size Distribution - Single Particle Light Interaction Methods	
	OECD Test Guideline 124: Determination of the Volume Specific Surface Area of Manufactured Nanomaterials (2022)	
	OECD Test Guideline 125: Particle Size and Particle Size Distribution of Nanomaterials (2023)	
	ISO/TR 14187:2020 - Surface chemical analysis -Characterization of nanostructured materials	

▼M10

Proprietà chimico-fisiche di base		
Endpoint	Metodo di prova	Capitolo corrispondente, che contiene la descrizione completa del metodo di prova, nella parte A del presente allegato (i riferimenti tra parentesi indicano che un metodo di prova è stato soppresso dalla parte A; casella vuota: nella parte A del presente allegato non figura nessun metodo di prova corrispondente)
▼M11		
Polverosità (per le nanoforme di una sostanza)	EN 17199-1:2019 Workplace exposure – Measurement of dustiness of bulk materials that contain or release respirable NOAA and other respirable particles – Part 1: Requirements and choice of test methods	
	EN 17199-2:2019 Workplace exposure – Measurement of dustiness of bulk materials that contain or release respirable NOAA and other respirable particles – Part 2: Rotating drum method	
	EN 17199-3:2019 Workplace exposure – Measurement of dustiness of bulk materials that contain or release respirable NOAA and other respirable particles – Part 3: Continuous drop method	
	EN 17199-4:2019 Workplace exposure – Measurement of dustiness of bulk materials that contain or release respirable NOAA and other respirable particles – Part 4: Small rotating drum method	
	EN 17199-5:2019 Workplace exposure – Measurement of dustiness of bulk materials that contain or release respirable NOAA and other respirable particles – Part 5: Vortex shaker method.	
	EN 15051-1:2013 Workplace exposure - Measurement of the dustiness of bulk materials - Part 1: Requirements and choice of test methods	
	EN 15051-2:2016 Workplace exposure - Measurement of the dustiness of bulk materials - Part 2: Rotating drum method	
	EN 15051-3:2013 Workplace exposure - Measurement of the dustiness of bulk materials - Part 3: Continuous drop method	
▼M10		
Tensione superficiale	OECD Test Guideline 115: Surface Tension of Aqueous Solutions (1995)	A.5.
Costante di dissociazione	OECD Test Guideline 112: Dissociation Constants in Water. (1981)	A.25.
Idrofobicità	OECD Test Guideline 126: Determination of the Hydrophobicity Index of Manufactured Nanomaterials Through an Affinity Measurement (2023)	

▼**M10**

Proprietà chimico-fisiche di base		
Endpoint	Metodo di prova	Capitolo corrispondente, che contiene la descrizione completa del metodo di prova, nella parte A del presente allegato (i riferimenti tra parentesi indicano che un metodo di prova è stato soppresso dalla parte A; casella vuota: nella parte A del presente allegato non figura nessun metodo di prova corrispondente)
Proprietà fisico-chimiche pericolose		
Esplosivi	Test methods for explosives according to section 2.1.2.1. and 2.1.2.3. of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
	EU Test method A.14 Explosive Properties	A.14.
Gas infiammabili	Test method for the fundamental burning velocity according to section 2.2.4.1. of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
	Test method for pyrophoric gases according to section 2.2.4.2. of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
	Test method for the chemical instability according to section 2.2.4.4. of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
Gas comburenti	Test method for oxidising gases according to section 2.4.4. of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
Liquidi infiammabili	Test method for the sustained combustibility according to section 2.6.4.5. of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
	Test methods for determining the flash point of flammable liquids according to section 2.6.4.4. of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
Solidi infiammabili	Test methods according to section 2.7.2.3. of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
Sostanze autoreattive	Test methods according to section 2.8.4.1. of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
Liquidi piroforici	Test methods according to section 2.9.2.1. of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
Solidi piroforici	Test method for pyrophoric solids according to section 2.10.2.1. of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008,	

▼**M10**

Proprietà chimico-fisiche di base		
Endpoint	Metodo di prova	Capitolo corrispondente, che contiene la descrizione completa del metodo di prova, nella parte A del presente allegato (i riferimenti tra parentesi indicano che un metodo di prova è stato soppresso dalla parte A; casella vuota: nella parte A del presente allegato non figura nessun metodo di prova corrispondente)
Sostanze autoriscaldanti	Test method for self-heating substances according to section 2.11.2.2 of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
Sostanze che, a contatto con l'acqua, sviluppano gas infiammabili	Test method for substances which in contact with water emit flammable gases according to section 2.12.2.1. of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
Liquidi comburenti	Test method for oxidising liquids according to section 2.13.2.1. of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
Solidi comburenti	Test methods according to section 2.14.2.1. of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
Perossidi organici	Test methods according to section 2.15.4.1. of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
Sostanze o miscele corrosive per i metalli	Test method for substances corrosive to metals according to section 2.16.2.1. of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
Esplosivi desensibilizzati	Test methods according to section 2.17.2.1 (b) and (c) and according to section 2.17.2.2 of Annex I, Part 2 of Regulation (EC) No 1272/2008	
Proprietà dei polimeri	OECD Test Guideline 118: Determination of the Number-Average Molecular Weight and the Molecular Weight Distribution of Polymers using Gel Permeation Chromatography (1996)	A.18.
	OECD Test Guideline 119: Determination of the Low Molecular Weight Content of a Polymer Using Gel Permeation Chromatography (1996)	A.19.
	OECD Test Guideline 120: Solution/Extraction Behaviour of Polymers in Water (2000)	(A.20.)

▼M9

TABELLA 2: METODI DI PROVA PER LE PROPRIETÀ TOSSICOLOGICHE

Endpoint	Metodo di prova	Capitolo corrispondente, contenente la descrizione completa del metodo di prova, nella parte B del presente allegato (i riferimenti tra parentesi indicano che un capitolo contenente la descrizione completa del metodo di prova è stato soppresso dalla parte B; casella vuota: nella parte B del presente allegato non figura nessun metodo di prova corrispondente)
Corrosione/irritazione cutanea	*In vitro:*	
	OECD Test Guideline 430: *In vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER) (2015)	B.40.
	OECD Test Guideline 431: *In vitro* Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test Method (2019)	(B.40 *bis*.)
	OECD Test Guideline 435: *In vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion (2015)	B.65.
	OECD Test Guideline 439: *In vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method (2021)	(B.46.)
	In vivo:	
	OECD Test Guideline 404: Acute Dermal Irritation/ Corrosion (2015)	B.4.

▼M11

Lesioni oculari gravi/irritazione oculare	*In vitro:*	
	OECD Test Guideline 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage (2023)	(B.47.)
	OECD Test Guideline 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage (2023)	(B.48.)
	OECD Test Guideline 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants (2023)	(B.61.)
	OECD Test Guideline 491: Short Time Exposure *In Vitro* Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage (2023)	(B.68.)
	OECD Test Guideline 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage (2024)	(B.69.)
	OECD Test Guideline 492B: Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RHCE) Test Method for Eye Hazard Identification (2024)	

▼M11

Endpoint	Metodo di prova	Capitolo corrispondente, contenente la descrizione completa del metodo di prova, nella parte B del presente allegato (i riferimenti tra parentesi indicano che un capitolo contenente la descrizione completa del metodo di prova è stato soppresso dalla parte B; casella vuota: nella parte B del presente allegato non figura nessun metodo di prova corrispondente)
	OECD Test Guideline 494: Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage (2021)	
	OECD Test Guideline 496: *In vitro* Macromolecular Test Method for Identifying Chemicals Inducing Serious Eye Damage and Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage (2024)	
	OECD Test Guideline 467: Defined Approaches for Serious Eye Damage and Eye Irritation (2024)	
▼M10	*In vivo:*	
	OECD Test Guideline 405: Acute Eye Irritation/Corrosion (2023)	(B.5.)
▼M11 Sensibilizzazione cutanea	*In vitro:*	
	OECD Test Guideline 442C: *In Chemico* Skin Sensitisation: Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to proteins (2024)	(B.59.)
	OECD Test Guideline 442D: *In Vitro* Skin Sensitisation: Assays Addressing the Adverse Outcome Pathway Key Event on Keratinocyte Activation (2024)	(B.60.)
	OECD Test Guideline 442E: *In Vitro* Skin Sensitisation: *In Vitro* Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation (2024)	(B.71.)
	OECD Test Guideline 497: Defined Approaches on Skin Sensitisation (2023)	
▼M9	*In vivo:*	
	OECD Test Guideline 429: Skin Sensitisation - Local Lymph Node Assay (2010)	B.42.
	OECD Test Guideline 442 A: Skin Sensitisation - Local Lymph Node Assay: DA (2010)	B.50.
▼M11	OECD Test Guideline 442B: Skin Sensitisation – Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or –FCM (2024)	(B.51.)
▼M9	OECD Test Guideline 406: Skin Sensitisation Guinea Pig Maximisation Test and Buehler Test (2022)	(B.6.)

▼M9

Endpoint	Metodo di prova	Capitolo corrispondente, contenente la descrizione completa del metodo di prova, nella parte B del presente allegato (i riferimenti tra parentesi indicano che un capitolo contenente la descrizione completa del metodo di prova è stato soppresso dalla parte B; casella vuota: nella parte B del presente allegato non figura nessun metodo di prova corrispondente)
Mutagenicità	*In vitro:*	
	OECD Test Guideline 471: Bacterial Reverse Mutation Test (2020)	(B.13./14.)
	OECD Test Guideline 476: *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test Using the Hprt and xprt Genes (2016)	(B.17.)
	OECD Test Guideline 490: *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene (2016)	B.67.
	OECD Test Guideline 473: *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test (2016)	B.10.
	►**M10** OECD Test Guideline 487. *In vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test (2023) ◄	►**M10** (B.49.) ◄
	In vivo:	
	OECD Test Guideline 475: Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (2016)	B.11.
	OECD Test Guideline 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (2016)	B.12.
	OECD Test Guideline 483: Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (2016)	B.23.
	OECD Test Guideline 488: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays (2022)	(B.58.)
	OECD Test Guideline 489: *In Vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay (2016)	B.62.
	OECD Test Guideline 470: Mammalian Erythrocyte Pig-a Gene mutation Assay (2022)	
Tossicità acuta	Per via orale:	
	OECD Test Guideline 420: Acute Oral Toxicity: Fixed Dose Procedure (2002)	B.1 *bis*.
	OECD Test Guideline 423: Acute Oral Toxicity: Acute Toxic Class Method (2002)	B.1 tris.
	OECD Test Guideline 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure (2022)	
	Per via cutanea:	
	OECD Test Guideline 402: Acute Dermal Toxicity - Fixed Dose Procedure (2017)	(B.3.)
	Per inalazione:	
▼M11 OECD Test Guideline 403: Acute Inhalation Toxicity (2024)		(B.2.)
▼M9 OECD Test Guideline 436: Acute Inhalation Toxicity - Acute Toxic Class Method (2009)		B.52.
	OECD Test Guideline 433: Acute Inhalation Toxicity: Fixed Concentration Procedure (2018)	

▼M9

Endpoint	Metodo di prova	Capitolo corrispondente, contenente la descrizione completa del metodo di prova, nella parte B del presente allegato (i riferimenti tra parentesi indicano che un capitolo contenente la descrizione completa del metodo di prova è stato soppresso dalla parte B; casella vuota: nella parte B del presente allegato non figura nessun metodo di prova corrispondente)
Tossicità a dose ripetuta	OECD Test Guideline 407: Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents (2008)	B.7.
	OECD Test Guideline 412: Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study (2018)	(B.8.)
	OECD Test Guideline 410: Repeated Dose Dermal Toxicity: 21/28-Day Study (1981)	B.9.
	OECD Test Guideline 422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (2016)	B.64.
	OECD Test Guideline 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents (2018)	(B.26.)
	OECD Test Guideline 409: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Non-Rodents (1998)	B.27.
	OECD Test Guideline 413: Subchronic Inhalation Toxicity: 90-Day Study (2018)	(B.29.)
	OECD Test Guideline 411: Subchronic Dermal Toxicity: 90-Day Study (1981)	B.28.
	OECD Test Guideline 452: Chronic Toxicity Studies (2018)	(B.30.)
	OECD Test Guideline 453: Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies (2018)	(B.33.)
Tossicità riproduttiva/ dello sviluppo	OECD Test Guideline 443: Extended One-Generation Reproduction Toxicity Study (2018)	(B.56.)
	OECD Test Guideline 421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (2016)	B.63.
	OECD Test Guideline 422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (2016)	B.64.
	OECD Test Guideline 414: Prenatal Developmental Toxicity Study (2018)	(B.31.)
Tossicocinetica	OECD Test Guideline 417: Toxicokinetics (2010)	B.36.
	OECD Test Guideline 428: Skin Absorption: *In Vitro* Method (2004)	B.45.
	OECD Test Guideline 427: Skin Absorption: *In Vivo* Method (2004)	B.44.

▼M9

Endpoint	Metodo di prova	Capitolo corrispondente, contenente la descrizione completa del metodo di prova, nella parte B del presente allegato (i riferimenti tra parentesi indicano che un capitolo contenente la descrizione completa del metodo di prova è stato soppresso dalla parte B; casella vuota: nella parte B del presente allegato non figura nessun metodo di prova corrispondente)
Cancerogenesi	OECD Test Guideline 451: Carcinogenicity Studies (2018)	(B.32.)
	OECD Test Guideline 453: Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies (2018)	(B.33.)
	EU test method B.21. *In Vitro* Mammalian Cell Transformation Test	B.21.
Neurotossicità (per lo sviluppo)	OECD Test Guideline 424: Neurotoxicity Study in Rodents (1997)	B.43.
	OECD Test Guideline 426: Developmental Neurotoxicity Study (2007)	B.53.
	OECD Test Guideline 418: Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances Following Acute Exposure (1995)	B.37.
	OECD Test Guideline 419: Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances: 28-day Repeated Dose Study (1995)	B.38.
Proprietà di interferenza con il sistema endocrino	*In vitro*	
	OECD Test Guideline 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonistsals (2021)	(B.66.)
	►M10 OECD Test Guideline 456: H295R Steroidogenesis Assay (2023) ◄	►M10 (B.57.) ◄
	►M10 OECD Test Guideline 458: Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (2023) ◄	
▼M11	OECD Test Guideline 493: Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) *In Vitro* Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity (2024)	(B.70.)
▼M9	*In vivo*	
	OECD Test Guideline 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents A short-term screening test for oestrogenic properties (2007)	B.54.
	OECD Test Guideline 441: Hershberger Bioassay in Rats, A Short-term Screening Assay for (Anti)Androgenic Properties (2009)	B.55.

▼M9

Endpoint	Metodo di prova	Capitolo corrispondente, contenente la descrizione completa del metodo di prova, nella parte B del presente allegato (i riferimenti tra parentesi indicano che un capitolo contenente la descrizione completa del metodo di prova è stato soppresso dalla parte B; casella vuota: nella parte B del presente allegato non figura nessun metodo di prova corrispondente)
Fototossicità	OECD Test Guideline 432: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test (2019)	(B.41.)
	OECD Test Guideline 495: Ros (Reactive Oxygen Species) Assay for Photoreactivity (2019)	
	►M10 OECD Test Guideline 498: *In vitro* Phototoxicity Reconstructed Human Epidermis Phototoxicity test method (2023) ◄	
▼M10 Immunotossicità	OECD Test Guideline 444 A: *In vitro* immunotoxicity IL-2 Luc assay (2023)	

▼M9

TABELLA 3: METODI DI PROVA PER LE PROPRIETÀ ECOTOSSICOLOGICHE

Endpoint	Metodo di prova	Capitolo corrispondente, contenente la descrizione completa del metodo di prova, nella parte C del presente allegato (i riferimenti tra parentesi indicano che un capitolo contenente la descrizione completa del metodo di prova è stato soppresso dalla parte C; casella vuota: nella parte C del presente allegato non figura nessun metodo di prova corrispondente)
Tossicità acquatica	OECD Test Guideline 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test (2011)	C.3.
	OECD Test Guideline 209: Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation) (2010)	C.11.
	OECD Test Guideline 224: Determination of the Inhibition of the Activity of Anaerobic Bacteria (2007)	C.34.
	OECD Test Guideline 244: Protozoan Activated Sludge Inhibition Test (2017)	
	OECD Test Guideline 221: Lemna sp. Growth Inhibition Test (2006)	C.26.
	OECD Test Guideline 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test (2004)	C.2.
	OECD Test Guideline 211: Daphnia magna Reproduction Test (2012)	C.20.
	OECD Test Guideline 203: Fish, Acute Toxicity Test (2019)	(C.1.)
	OECD Test Guideline 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test (2013)	C.47.
	OECD Test Guideline 215: Fish, Juvenile Growth Test (2000)	C.14.

▼M9

Endpoint	Metodo di prova	Capitolo corrispondente, contenente la descrizione completa del metodo di prova, nella parte C del presente allegato (i riferimenti tra parentesi indicano che un capitolo contenente la descrizione completa del metodo di prova è stato soppresso dalla parte C; casella vuota: nella parte C del presente allegato non figura nessun metodo di prova corrispondente)
	OECD Test Guideline 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test (2013)	C.49.
	OECD Test Guideline 249: Fish Cell Line Acute Toxicity - the RTgill-W1 Cell Line Assay (2021)	
	OECD Test Guideline 242: Potamopyrgus antipodarum Reproduction Test (2016)	
	OECD Test Guideline 243: Lymnaea stagnalis Reproduction Test (2016)	
Degradazione	OECD Test Guideline 111: Hydrolysis as a Function of pH (2004)	C.7.
	OECD Test Guideline 301: Ready Biodegradability (1992)	C.4.
	OECD Test Guideline 302 A: Inherent Biodegradability: Modified SCAS Test (1981)	C.12.
	OECD Test Guideline 302 B: Inherent Biodegradability: Zahn-Wellens/EMPA Test (1992)	(C.9).
	OECD Test Guideline 302C: Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II) (2009)	
	OECD Test Guideline 303: Simulation Test - Aerobic Sewage Treatment – A: Activated Sludge Units; B: Biofilms (2001)	C.10.
	OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (1981)	
	OECD Test Guideline 306: Biodegradability in Seawater (1992)	C.42.
	OECD Test Guideline 307: Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil (2002)	C.23.
	OECD Test Guideline 308: Aerobic and Anaerobic Transformation in Aquatic Sediment Systems (2002)	C.24.
	OECD Test Guideline 309: Aerobic Mineralisation in Surface Water – Simulation Biodegradation Test (2004)	C.25.
	OECD Test Guideline 310: Ready Biodegradability - CO_2 in sealed vessels (Headspace Test) (2014)	C.29.
	OECD Test Guideline 311: Anaerobic Biodegradability of Organic Compounds in Digested Sludge: by Measurement of Gas Production (2006)	C.43.

▼M9

Endpoint	Metodo di prova	Capitolo corrispondente, contenente la descrizione completa del metodo di prova, nella parte C del presente allegato (i riferimenti tra parentesi indicano che un capitolo contenente la descrizione completa del metodo di prova è stato soppresso dalla parte C; casella vuota: nella parte C del presente allegato non figura nessun metodo di prova corrispondente)
	OECD Test Guideline 314: Simulation Tests to Assess the Biodegradability of Chemicals Discharged in Wastewater (2008)	
	►M10 OECD Test Guideline 316: Phototransformation of Chemicals in Water – Direct Photolysis (2023) ◄	
	EU test method C.5. Degradation – Biochemical Oxygen Demand	C.5.
	EU test method C.6. Degradation – Chemical Oxygen Demand	C.6.
Destino e comportamento nell'ambiente	OECD Test Guideline 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure (2012)	C.13.
	OECD Test Guideline 315: Bioaccumulation in Sediment-Dwelling Benthic Oligochaetes (2008)	C.46.
	OECD Test Guideline 317: Bioaccumulation in Terrestrial Oligochaetes (2010)	C.30.
	OECD Test Guideline 318: Dispersion Stability of Nanomaterials in Simulated Environmental MEDIA (2017)	
	OECD Test Guideline 121: Estimation of the Adsorption Coefficient (Koc) on Soil and on Sewage Sludge using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (2001)	C.19.
	OECD Test Guideline 106: Adsorption - Desorption Using a Batch Equilibrium Method (2000)	C.18.
	OECD Test Guideline 312: Leaching in Soil Columns (2004)	C.44.
	OECD Test Guideline 313: Estimation of Emissions from Preservative - Treated Wood to the Environment (2007)	C.45.
	OECD Test Guideline 319 A: Determination of In Vitro Intrinsic Clearance Using Cryopreserved Rainbow Trout Hepatocytes (RT-HEP) (2018)	
	OECD Test Guideline 319 B: Determination of In Vitro Intrinsic Clearance Using Rainbow Trout Liver S9 Sub-Cellular Fraction (RT-S9) (2018)	
	OECD Test Guideline 320: Anaerobic Transformation of Chemicals in Liquid Manure (2022)	

▼M9

Endpoint	Metodo di prova	Capitolo corrispondente, contenente la descrizione completa del metodo di prova, nella parte C del presente allegato (i riferimenti tra parentesi indicano che un capitolo contenente la descrizione completa del metodo di prova è stato soppresso dalla parte C; casella vuota: nella parte C del presente allegato non figura nessun metodo di prova corrispondente)
▼M11	OECD Test Guideline 321: *Hyalella azteca* Bioconcentration Test (HYBIT) (2024)	
▼M9		
Effetti sugli organismi terrestri	OECD Test Guideline 216: Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test (2000)	C.21.
	OECD Test Guideline 217: Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test (2000)	C.22.
	OECD Test Guideline 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests (1984)	C.8.
	OECD Test Guideline 222: Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/Eisenia andrei) (2016)	(C.33.)
	OECD Test Guideline 220: Enchytraeid Reproduction Test (2016)	(C.32.)
	OECD Test Guideline 226: Predatory Mite (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) Reproduction Test in Soil (2016)	(C.36.)
	OECD Test Guideline 232: Collembolan Reproduction Test in Soil (2016)	(C.39.)
	OECD Test Guideline 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test (2006)	C.31.
	OECD Test Guideline 227: Terrestrial Plant Test: Vegetative Vigour Test (2006)	
Effetti sugli organismi presenti nei sedimenti terrestri	►M10 OECD Test Guideline 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment (2023) ◄	►M10 (C.27.) ◄
	►M10 OECD Test Guideline 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water (2023) ◄	►M10 (C.28.) ◄
	OECD Test Guideline 233: Sediment-Water Chironomid LIFE-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment (2010)	C.40.
	OECD Test Guideline 235: Chironomus sp., Acute Immobilisation Test (2011)	
	OECD Test Guideline 225: Sediment-Water Lumbriculus Toxicity Test Using Spiked Sediment (2007)	C.35.
	OECD Test Guideline 238: Sediment-Free Myriophyllum Spicatum Toxicity Test (2014)	C.50.
	OECD Test Guideline 239: Water-Sediment Myriophyllum Spicatum Toxicity Test (2014)	C.51.

▼**M9**

Endpoint	Metodo di prova	Capitolo corrispondente, contenente la descrizione completa del metodo di prova, nella parte C del presente allegato (i riferimenti tra parentesi indicano che un capitolo contenente la descrizione completa del metodo di prova è stato soppresso dalla parte C; casella vuota: nella parte C del presente allegato non figura nessun metodo di prova corrispondente)
Effetti sull'avifauna	OECD Test Guideline 205: Avian Dietary Toxicity Test (1984)	
	OECD Test Guideline 206: Avian Reproduction Test (1984)	
	OECD Test Guideline 223: Avian Acute Oral Toxicity Test (2016)	
Effetti sugli insetti	OECD Test Guideline 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test (1998)	C.16.
	OECD Test Guideline 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test (1998)	C.17.
	OECD Test Guideline 237: Honey Bee (Apis Mellifera) Larval Toxicity Test, Single Exposure (2013)	
	OECD Test Guideline 245: Honey Bee (Apis Mellifera L.), Chronic Oral Toxicity Test (10-Day Feeding) (2017)	
	OECD Test Guideline 246: Bumblebee, Acute Contact Toxicity Test (2017)	
	OECD Test Guideline 247: Bumblebee, Acute Oral Toxicity Test (2017)	
	OECD Test Guideline 228: Determination of Developmental Toxicity to Dipteran Dung Flies (Scathophaga stercoraria L. (Scathophagidae), Musca autumnalis De Geer (Muscidae)] (2016)	
Proprietà di interferenza con il sistema endocrino	OECD Test Guideline 230: 21-Day Fish Assay (2009)	C.37.
	OECD Test Guideline 229: Fish Short Term Reproduction Assay (2012)	C.48.
	OECD Test Guideline 231: Amphibian Metamorphosis Assay (2009)	C.38.
	OECD Test Guideline 234: Fish Sexual Development Test (2011)	C.41.
	►**M10** OECD Test Guideline 240: Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT) (2023) ◄	►**M10** (C.52.) ◄
	OECD Test Guideline 241: The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA) (2015)	C.53».
	OECD Test Guideline 248: Xenopus Eleutheroembryonic Thyroid Assay (XETA) (2019)	
	OECD Test Guideline 250: EASZY assay - Detection of Endocrine Active Substances, Acting Through Estrogen Receptors, Using Transgenic tg(cyp19a1b:GFP) Zebrafish embrYos (2021)	
	OECD Test Guideline 251: Rapid Androgen Disruption Activity Reporter (RADAR) Assay (2022)	
▼**M11**	OECD Test Guideline 252: Rapid Estrogen Activity *In Vivo* (REACTIV) assay (2024)	
	OECD Test Guideline 253: Short-term Juvenile Hormone Activity Screening Assay using *Daphnia magna* (JHASA) (2024)	

▼B

PARTE A: METODI PER LA DETERMINAZIONE DELLE PROPRIETÀ FISICO-CHIMICHE

INDICE

A.1. TEMPERATURA DI FUSIONE/CONGELAMENTO

A.2. TEMPERATURA DI EBOLLIZIONE

A.3. DENSITÀ RELATIVA

A.4. TENSIONE DI VAPORE

A.5. TENSIONE SUPERFICIALE

A.6. IDROSOLUBILITÀ

A.8. COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE

A.9. PUNTO D'INFIAMMABILITÀ

A.10. INFIAMMABILITÀ (SOLIDI)

A.ll. INFIAMMABILITÀ (GAS)

A.12. INFIAMMABILITÀ (CONTATTO CON L'ACQUA)

A.13. PROPRIETÀ PIROFORICHE DI SOLIDI E LIQUIDI

A.14. PROPRIETÀ ESPLOSIVE

A.15. TEMPERATURA DI AUTOACCENSIONE (LIQUIDI E GAS)

A.16. TEMPERATURA DI AUTOACCENSIONE RELATIVA DEI SOLIDI

A.17. PROPRIETÀ OSSIDANTI (SOLIDI)

A.18. PESO MOLECOLARE MEDIO NUMERICO E DISTRIBUZIONE DEL PESO MOLECOLARE DI POLIMERI

A.19. CONTENUTO DI FRAZIONI A BASSO PESO MOLECOLARE IN POLIMERI

A.20. COMPORTAMENTO DI SOLUZIONE/ESTRAZIONE DEI POLIMERI IN ACQUA

A.21. PROPRIETÀ COMBURENTI (LIQUIDI)

A.22. DIAMETRO GEOMETRICO MEDIO DELLE FIBRE PONDERATO RISPETTO ALLA LUNGHEZZA

A.23. COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE (1-OTTANOLO/ACQUA): METODO DELL'AGITAZIONE LENTA

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

A.25. COSTANTI DI DISSOCIAZIONE IN ACQUA (METODO DELLA TITOLAZIONE — METODO SPETTROFOTOMETRICO — METODO CONDUTTIMETRICO)

▼B

A.1. TEMPERATURA DI FUSIONE/CONGELAMENTO

1. METODO

La maggior parte dei metodi descritti si basano sulle linee direttrici OCSE (1). I principi fondamentali sono riportati nei riferimenti (2) e (3).

1.1. INTRODUZIONE

I metodi e le apparecchiature qui illustrati si applicano alla determinazione della temperatura di fusione di sostanze senza alcuna limitazione rispetto al loro grado di purezza.

La scelta del metodo più idoneo dipende dalla natura delle sostanze in esame. Di conseguenza, il fattore limitante sarà inerente ai fatto che la sostanza sia facilmente, difficilmente o per nulla polverizzabile.

Per alcune sostanze, la determinazione della temperatura di congelamento o di solidificazione risulta più appropriata e pertanto in questo metodo sono state incluse anche le norme per queste determinazioni.

Dove, a motivo delle particolari proprietà della sostanza, non sia possibile misurare in modo adatto alcuni dei parametri suddetti, può essere appropriato un punto di scorrimento.

1.2. DEFINIZIONI ED UNITÀ

La temperatura di fusione è definita come la temperatura alla quale si verifica la transizione di fase dallo stato solido allo stato liquido a pressione atmosferica, e questa temperatura nel caso ideale corrisponde alla temperatura di congelamento.

Poiché per molte sostanze la transizione di fase si verifica in un intervallo di temperatura ampio, questo viene spesso descritto come intervallo di fusione.

Conversione delle unità (da K a ^{o}C):

$t = T - 273{,}15$

t: temperatura Celsius, gradi Celsius (^{o}C)

T: temperatura termodinamica, kelvin (K)

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Non è necessario utilizzare sostanze di riferimento ogni volta che si esamina una nuova sostanza. Esse devono principalmente venire impiegate per controllare periodicamente i risultati ottenuti col metodo e per permettere confronti con i risultati ottenuti con altri metodi.

Alcune sostanze di riferimento sono elencate nel riferimento bibliografico (4).

▼B

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

Si determina la temperatura (o l'intervallo di temperatura) della transizione di fase dallo stato solido allo stato liquido o dallo stato liquido allo stato solido. In pratica si determina la temperatura di fusione/congelamento incipiente e di fusione/congelamento finale curante il riscaldamento/raffreddamento di un campione della sostanza in esame a pressione atmosferica. Sona descritti 5 metodi, e precisamente il metodo del capillare, il metodo degli elementi riscaldanti, la determinazione del punto di congelamento, i metodi di analisi termica e la determinazione del punto di scorrimento (come è stata sviluppata per gli olii di origine petrolifera).

In alcuni casi, può essere conveniente misurare la temperatura di congelamento invece della temperatura di fusione.

1.4.1. **Metodo del capillare**

1.4.1.1. *Apparecchi per la determinazione del punto di fusione tramite bagno liquido*

Una piccola quantità della sostanza finemente macinata viene introdotta in un tubo capillare e compattata fortemente. Il tubo viene riscaldato, insieme ad un termometro, e l'aumento di temperatura viene regolato in modo che sia inferiore a circa 1 K/min durante la fusione propriamente detta. Si determinano quindi le temperature iniziale e finale di fusione.

1.4.1.2. *Apparecchi per la determinazione del punto di fusione a blocco metallico*

Si procede come indicato al punto 1.4.1.1, salvo il fatto che i tubo capillare ed il termometro sono collocati in un blocco di metallo riscaldante, attraverso alcuni fori del quale è possibile la loro osservazione.

1.4.1.3. *Determinazione tramite fotocellula*

Il campione contenuto nel tubo capillare viene riscaldato automaticamente in un cilindro metallico. Attraverso un foro praticato nel cilindro un raggio luminoso viene convogliato sulla sostanza e raggiunge poi una fotocellula accuratamente tarata. Per la maggior parte delle sostanze le proprietà ottiche si modificano durante la fusione, passando dall'opacità alla trasparenza. L'intensità della luce che raggiunge la fotocellula aumenta fino ad inviare un segnale di arresto all'indicatore numerico di un termometro a resistenza di platino collocato nella camera di riscaldamento. Questo metodo non è adatto per alcune sostanze fortemente colorate.

1.4.2. **Elementi riscaldanti**

1.4.2.1. *Banco riscaldante di Kofler*

Il banco riscaldante di Kofler fa uso di due corpi metallici di diversa conducibilità termica, riscaldati elettricamente; la sbarra è progettata in modo tale che per tutta la sua lunghezza il gradiente di temperatura è virtualmente costante. La temperatura dell'elemento riscaldante può variare da 283 K a 573 K; essa viene letta su un apposito strumento costituito da un cursore provvisto di indice e di linguetta specificamente realizzati per ogni banco. Per determinare una temperatura di fusione, la sostanza viene distribuita in uno strato sottile direttamente sulla superficie dell'elemento riscaldante. In pochi secondi appare una linea di separazione netta tra la fase solida e quella liquida. La temperatura corrispondente a questa linea di separazione viene letta facendovi coincidere l'indice dello strumento.

▼B

1.4.2.2. *Microscopio di fusione*

Numerosi sono gli elementi riscaldanti forniti di microscopio utilizzati per la determinazione del punto di fusione con quantità molto piccole di materiale. Nella maggioranza di questi strumenti, la temperatura viene determinata mediante una termocoppia sensibile, ma talvolta si usano anche termometri a mercurio. La versione tipica di un apparecchio per la determinazione del punto di fusione ad elemento riscaldante con microscopio è dotata di una camera di riscaldamento contenerne una piastra metallica sopra la quale si pone il campione, distribuito su un vetrino. Al centro della piastra metallica si trova un foro che permette il passaggio della luce proveniente dallo specchio di illuminazione del microscopio. Durante la misura la camera viene chiusa da una piastra di vetro in modo da escludere l'aria dalla zona del campione.

Il riscaldamento del campione è regolato da un reostato. Per misure di grande precisione e nel caso di sostanze otticamente anisotrope, si può utilizzare luce polarizzata.

1.4.2.3. *Metodo del menisco*

Questo metodo è specifico per le poliammidi.

Si determina visivamente la temperatura alla quale si verifica lo spostamento di un menisco di olio siliconico compreso tra un elemento riscaldante e un copri-oggetti sostenuto dal campione di poliammide in esame.

1.4.3 **Metodo per determinare la temperatura di congelamento**

Il campione viene posto in una provetta speciale e inserito in un apparecchio per la determinazione della temperatura di congelamento. Il campione viene agitato con delicatezza e continuità durante il raffreddamentoe la temperatura viene misurata ad intervalli adatti. Non appena la temperatura si mantiene costante per qualche lettura, si registra tale temperatura (corretta per l'errore termometrico) come temperatura di congelamento.

Si deve evitare un sovraraffreddamento mantenendo l'equilibrio tra le fasi solida e liquida.

1.4.4. **Analisi termica**

1.4.4.1. *Analisi termica differenziale (ATD)*

Questa tecnica registra la differenza di temperatura tra la sostanza e un materiale di riferimento in funzione della temperatura stessa mentre la sostanza e il materiale di riferimento sono sottoposti allo stesso programma controllato di temperatura. Quando il campione subisce una transizione che implica una variazione di entalpia, tale variazione è indicata da una deviazione endotermica (fusione) o esotermica (congelamento) dalla linea di base del tracciato della temperatura.

▼B

1.4.4.2. *Calorimetria differenziale a scansione (CDS)*

Questa tecnica registra la differenza tra l'energia introdotta in una sostanza e quella introdotta in un materiale di riferimento, in funzione della temperatura, mentre la sostanza e il materiale di riferimento sono sottoposti allo stesso programma controllato di temperatura. Questa energia è l'energia necessaria per mantenere nulla la differenza di temperatura tra la sostanza e il materiale di riferimento. Quando il campione subisce una transizione che implica una variazione di entalpia, tale variazione è indicata da una deviazione endotermica (fusione) o esotermica (congelamento) dalla linea di base del tracciato del flusso termico.

1.4.5. **Punto di scorrimento**

Questo metodo è stato sviluppato per l'uso con gli olii di origine petrolifera ed è adatto per l'uso con sostanze oleose aventi una bassa temperatura di fusione.

Dopo un riscaldamento preliminare, il campione viene raffreddato ad una velocità specifica mentre, ad intervalli di 3 K, se ne esaminano le caratteristiche di scorrimento. La temperatura più bassa alla quale si osserva un movimento della sostanza viene registrata come punto di scorrimento.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

L'applicabilità e l'accuratezza dei vari metodi impiegati per la determinazione della temperatura di fusione/intervallo di fusione sono indicate nella seguente tabella.

TABELLA: APPLICABILITÀ DEI METODI

A. **Metodi con impiego di capillare**

Metodo di misura	Sostanze polverizzabili	Sostanze difficilmente polverizzabili	Intervallo di temperatura	Accuratezza stimata [1]	Norme esistenti
Apparecchi per il punto di fusione a bagno liquido	Sì	Soltanto per alcune	Da 273 a 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Apparecchi per il punto di fusione con blocco metallico	Sì	Soltanto per alcune	Da 293 a > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Determinazione con fotocellula	Sì	Svariate, con uso di accessori	Da 253 a 573 K	± 0,5 K	

[1] In funzione del tipo di strumento e del grado di purezza della sostanza.

▼B

B. **Metodi con impiego di elementi riscaldanti e metodi di congelamento**

Metodo di misura	Sostanze polverizzabili	Sostanze difficilmente polverizzabili	Intervallo di temperatura	Accuratezza stimata (1)	Norme esistenti
Banco riscaldante di Kofler	Sì	No	Da 283 a > 573 K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 345176
Microscopio di fusione	Sì	Soltanto per alcune	Da 273 a > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Metodo del menisco	No	Specifico per le poliammidi	Da 293 a > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Metodo del punto di congelamento	Sì	Sì	Da 223 a 573 K	± 0,5 K	per esempio BS 4695

(1) In funzione del tipo di strumento e del grado di purezza della sostanza.

C. **Analisi termica**

Metodo di misura	Sostanze polverizzabili	Sostarne difficilmente polverizzabili	Intervallo di temperatura	Accuratezza stimata (1)	Norme esistenti
Analisi termica differenziale	Sì	Sì	Da 173 a 1 273 K	Fino a 600 K ± 0,5 K Fino a 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 53776
Calorimetria differenziate a scansione	Sì	Sì	Da 173 a 1 273 K	Fino a 600 K ± 0,5 K Fino a 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 53776

(1) In funzione del tipo di strumento e del grado di purezza della sostanza

D. **Punto di scorrimento**

Metodo di misura	Sostanze polverizzabili	Sostanze difficilmente polverizzabili	Intervallo di temperatura	Accuratezza stimata (1)	Norme esistenti
Punto di scorrimento	Per olii di origine petrolifera e sostanze oleose	Per olii di origine petrolifera e sostanze oleose	Da 223 a 323 K	± 0,3 K	ASTM D 9766

(1) In funzione del tipo di strumento e del grado di purezza della sostanza.

1.6. DESCRIZIONE DEI METODI

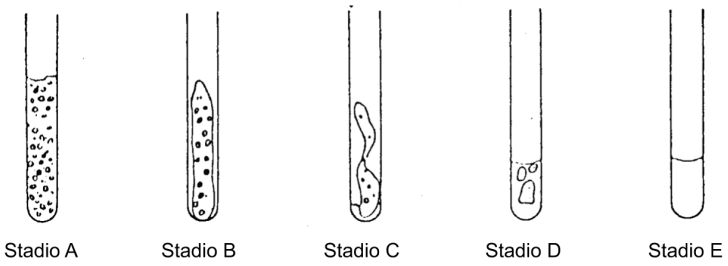
Le procedure relative a quasi tutti i metodi di determinazione sono state descritte in varie norme internazionali nazionali (vedi appendice 1).

1.6.1. **Metodi con tubo capillare**

Quando vengono sottoposte ad un lento aumento di temperatura, sostanze finemente polverizzate mostrano solitamente gli stadi di fusione mostrati in figura 1.

▼B

figura 1.



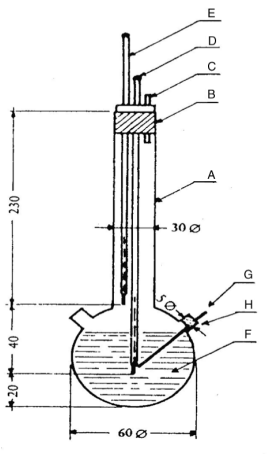
Stadio A	(inizio della fusione): minuscole goccioline aderiscono uniformemente alla parete interna del capillare;
Stadio B	in seguito alla contrazione del fuso, va evidenziandosi uno spazio libero tra il campione e la parete interna;
Stadio C	dopo essersi contratto, il campione inizia a scivolare in basso ed a liquefarsi;
Stadio D	si ha la formazione di un menisco completo alla superficie, ma una quantità apprezzabile del campione rimane solida;
Stadio E	(stadio finale della fusione): non restano più particelle solide.

Durante la determinazione della temperatura di fusione viene registrata la temperatura all'inizio delia fusione e nello stadio finale.

1.6.1.1. *Apparecchi per il punto di fusione a bagno liquido*

La figura 2 presenta un tipo di apparecchio normalizzato, realizzato in vetro, per la temperatura di fusione (JIS K0064): tutte le quote sono date in mm.

Figura 2



A: Recipiente di misura
B: Tappo di sughero
C: Sfogo
D: Termometro
E: Termometro ausiliario
F: Bagno liquido
G: Tubo capillare in vetro: lunghezza da 80 a 10 mm ; diametro interno 1 ± 0,2 mm ; spessore da 0,2 a 0,3 mm
H: Tubo laterale

▼B

Bagno liquido:

Si deve scegliere un liquido adatto. La scelta del liquido dipende dalla temperatura di fusione da determinare, per esempio paraffina liquida per temperature di fusione non superiori a 473 K, olio di silicone per temperature di fusione non maggiori di 573 K.

Per temperature di fusione superiori a 523 K, si può usare una miscela costituita da 3 parti di acido solforico e 2 parti di solfato di potassio (rapporto in peso). Se si usa una miscela di questo tipo occorre prendere opportune precauzioni.

Termometro:

Vanno impiegati soltanto termometri che soddisfano le prescrizioni delle norme ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001, o di norme equivalenti.

ASTM E 1671, DIN 12770, JIS K 8001.

Modalità operative:

La sostanza secca va polverizzata finemente in un mortaio e posta in un tubo capillare, chiuso per fusione ad una estremità, in modo che, dopo assestamento nella maniera più compatta possibile, l'altezza del riempimento sia di 3 mm circa. Per ottenere un assestamento uniforme del campione, il tubo capillare deve essere lasciato cadere attraverso una canna di vetro su un vetro da orologio da un'altezza di circa 700 mm.

Il capillare riempito viene posto nel bagno in modo tale che la parte centrale del bulbo del termometro a mercurio sia in contatto con il tubo capillare nella zona dove è collocato il campione. Il tubo capillare viene di solito introdotto nell'apparecchio a temperatura inferiore di circa 10 K a quella della temperatura di fusione.

Il bagno liquido viene riscaldato in modo che l'aumento di temperatura corrisponda a circa 3 K/min. Il liquido va mantenuto sotto agitazione. A circa 10 K al di sotto della temperatura prevista di fusione, la velocità di incremento della temperatura va regolata ad un massimo di 1 K/min.

Calcolo:

La temperatura fusione si calcola con la formula seguente:

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

dove:

T = temperatura di fusione corretta, in K,

T_D = temperatura letta sul termometro D, in K,

T_E = temperatura letta sul termometro E, in K,

n = numero di graduazioni della colonnina di mercurio sul termometro D sulla parte di stelo emergente.

1.6.1.2. *Apparecchi per la temperatura di fusione con blocco metallico*

Apparecchiatura:

La strumentazione consiste in:

— un blocco cilindrico di metallo, la cui parte superiore è cava e forma una camera (vedi figura 3);

— un tappo metallico provvisto di due o più fori per permettere l'inserimento dei tubi capillari nel blocco metallico;

▼B

— un sistema di riscaldamento per il blocco metallico realizzato, per esempio, tramite una resistenza elettrica incorporata nel blocco;

— un reostato per la regolazione della potenza applicata, se si fa uso del riscaldamento elettrico;

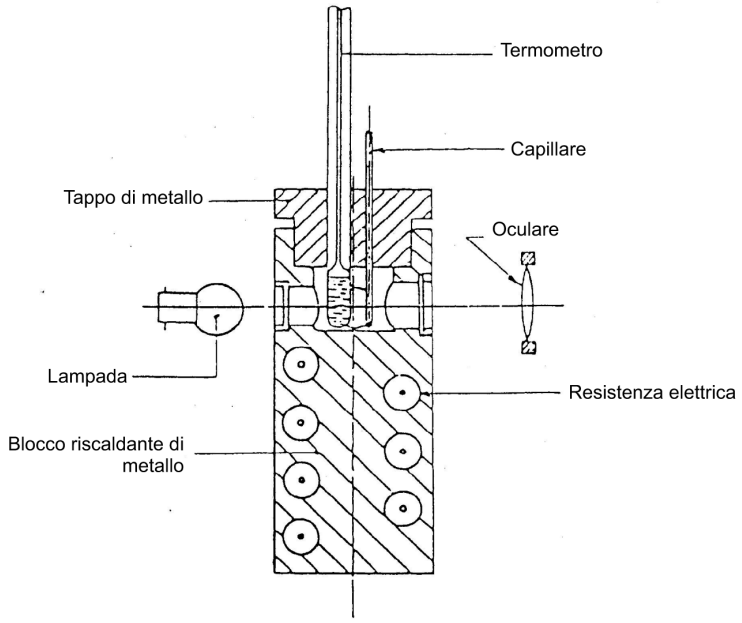
— quattro finestre di vetro resistente al calore sulle pareti laterali della camera, disposte diametralmente ad angolo retto l'una rispetto all'altra. Di fronte ad una di esse è montato un oculare per l'osservazione del capillare. Le altre tre finestre vengono usate per illuminare l'interno per mezzo di lampade;

— un capillare di vetro resistente al calore chiuso ad una estremità (vedi punto 1.6.1.1).

Termometro:

Vedi norme citate al punto 1.6.1.1. Possono utilizzarsi anche strumenti di misura termoelettrici di analoga accuratezza.

Figura 3



1.6.1.3. *Determinazione tramite fotocellula*

Apparecchiatura e modalità operative:

La strumentazione consiste in una camera metallica con un sistema automatico di riscaldamento. Si riempiono tre capillari secondo le indicazioni del punto 1.6.1.1 e si pongono nella camera.

▼B

Per la taratura dell'apparecchio sono disponibili diverse velocità di incremento lineare della temperatura e l'aumento di temperatura opportuno viene regolato elettricamente su una velocità costante e lineare preselezionata. La temperatura effettiva nel forno e la temperatura della sostanza nei tubi capillari sono indicare da registratori.

1.6.2. **Elementi riscaldanti**

1.6.2.1. *Banco riscaldante di Kofler*

Vedi appendice.

1.6.2.2. *Microscopio di fusione*

Vedi appendice.

1.6.2.3. *Metodo del menisco (per poliammidi)*

Vedi appendice.

La velocità di riscaldamento nella zona di passaggio attraverso la temperatura di fusione deve essere inferiore a 1 K/min.

1.6.3. **Metodi per la determinazione della temperatura di congelamento**

Vedi appendice.

1.6.4. **Analisi termica**

1.6.4.1. *Analisi termica differenziale*

Vedi appendice.

1.6.4.2. *Calorimetria differenziale a scansione*

Vedi appendice.

1.6.5. **Determinazione del punto di scorrimento**

Vedi appendice.

2. **DATI**

In alcuni casi si rende necessaria una correzione della lettura termometrica.

3. **RELAZIONE**

La relazione sulla prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— metodo utilizzato;

— descrizione precisa della sostanza (identità e impurezze) ed eventuale stadio preliminare di purificazione;

— stima dell'accuratezza.

Come temperatura di fusione viene riportata la media di almeno due misure che cadano nel campo di accuratezza stimata (vedi tabelle).

▼B

Se la differenza tra la temperatura all'inizio e allo stadio finale della fusione ricade nei limiti di accuratezza del metodo, si prende come punto di fusione la temperatura dello stadio finale della fusione; altrimenti vengono riportate ambedue le temperature.

Se la sostanza si decompone o sublima prima del raggiungimento della temperatura di fusione, si riporterà la temperatura alla quale si osserva l'effetto.

Devono essere riportate tutte le informazioni e osservazioni utili per l'interpretazione dei risultati, in particolare per quanto riguarda le impurezze e lo stato fisico della sostanza.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II, 803-834.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.

(4) IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials, from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol, 48, 505-515.

▼B

Appendice

Per ulteriori particolari tecnici, si possono consultare ad esempio le seguenti norme:

1. **Metodi basati sull'impiego di capillari**

1.1. Apparecchi per la determinazione del punto di fusione a bagno liquido

ASTM E 324-69	Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals
BS 4634	Method for the determination of melting point and/or melting range
DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products

1.2. Apparecchi per la determinazione della temperatura di fusione a blocco di metallo

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics — polyarnides — determination of «melting point»

2. **Apparecchi ed elementi riscaldanti**

2.1. Banco riscaldante di Kofler

ANSI/ASTM D 3451-76	Standard recommended practices for testing; polymeric powder coatings

2.2. Microscopio di fusione

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3. Metodo del menisco (poliammidi)

ISO 1218 (E)	Plastics — polyarnides — determination of «melting point»

▼B

ANSI/ASTM D2133-66	Standard specification for acetal resin injection; moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Résines de polyamides. Détermination du «point de fusion». Méthode du ménisque

3. **Metodi per la determinazione della temperatura di congelamento**

BS 4633	Method for the determination of crystallizing point
BS 4695	Method for determination of melting point of petroleum wax (Cooling Curve)
DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207	Cires de pétrole: détermination de la température de figeage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsauren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristalisation (point de congélation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. **Analisi termica**

4.1. Analisi termica differenziale

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis

▼B

ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

4.2. Calorimetria differenziale a scansione

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

5. **Determinazione del punto di scorrimento**

NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement limite — Monstememing en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
ISO 3016	Petroleum oils — Determination of pour point.

▼B

A.2. TEMPERATURA DI EBOLLIZIONE

1. METODO

La maggior parte dei metodi descritti sono basati sulle linee direttrici OCSE (1). I principi fondamentali sono riportati nei riferimenti (2) e (3).

1.1. INTRODUZIONE

I metodi e le apparecchiature qui illustrati possono essere applicati a sostanze liquide e a bassa temperatura di fusione, purché queste non siano soggette a reazioni chimiche al di sotto della temperatura di ebollizione (per esempio: autoossidazione, trasposizione, degradazione, ecc.). I metodi possono essere applicati a sostanze liquide sia pure che impure.

Si dà particolare risalto ai metodi che utilizzano la determinazione tramite fotocellula e l'analisi termica perché questi metodi permettono la determinazione sia della temperatura di fusione che della temperatura di ebollizione. Inoltre, le misure possono essere eseguite in automatico.

Il «metodo dinamico» ha il vantaggio di poter essere applicato anche alla determinazione della tensione di vapore e di non richiedere la correzione della temperatura di ebollizione per riferirla alla pressione normale (101,325 kPa) dal momento che la pressione normale può essere regolata durante la misura mediante un manostato.

Osservazioni:

L'influenza delle impurezze sulla determinazione della temperatura di ebollizione dipende in notevole misura dalla natura delle impurezze. Quando il campione contiene impurezze volatili che possono alterare i risultati, la sostanza può venire purificata.

1.2. DEFINIZIONI E UNITÀ

La temperatura di ebollizione normale è definita come la temperatura alla quale la tensione di vapore di un liquido è di 101,325 kPa.

Se la temperatura di ebollizione non viene misurata alla pressione atmosferica normale, la dipendenza della tensione di vapore dalla temperatura può essere descritta mediante l'equazione di Clausius-Clapeyron:

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

dove:

p = tensione di vapore della sostanza in Pascal,

ΔH_v = calore di evaporazione in J mol^{-1},

R = costante universale dei gas = 8,314 J mol^{-1} K^{-1},

T = temperatura termodinamica in K.

La temperatura di ebollizione è riferita alla pressione ambiente al momento della misura.

▼B

Fattori di conversione

Pressione (unità: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(«bar» è ancora ammissibile, ma non raccomandato).

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(le unità «mm Hg» e «Torr» non sono permesse).

1 atm = atmosfera standard = 101 325 Pa

(l'unità «atm» non è permessa).

Temperatura (unità: K)

t = T - 273,15

t: temperatura Celsius, gradi Celsius (^{o}C)

T: temperatura termodinamica, Kelvin (K)

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Non è necessario utilizzare sostanze di riferimento in tutti i casi in cui si esamina una nuova sostanza. Esse servono principalmente per controllare periodicamente l'accuratezza del metodo e per permettere un confronto coi risultati ottenuti con altri metodi.

Alcune sostanze di riferimento sono elencate nei metodi riportati in appendice.

1.4. PRINCIPIO DEI METODI

Cinque metodi per la determinazione della temperatura di ebollizione (intervallo di ebollizione) sono basati sulla misura della temperatura di ebollizione, altri due sono basati sull'analisi termica.

1.4.1. **Determinazione tramite ebulliometro**

Gli ebulliometri sono stati originariamente concepiti per la determinazione del peso molecolare tramite l'innalzamento della temperatura di ebollizione, ma si prestano anche per accurate misure della temperatura di ebollizione. Una apparecchiatura molto semplice è descritta nella norma ASTM D 1120-72 (vedi appendice). Con questo strumento il liquido viene riscaldato fino all'ebollizione in condizioni di equilibrio a pressione atmosferica.

1.4.2. **Metodo dinamico**

Questo metodo implica la misura della temperatura di ricondensazione del vapore mediante un appropriato termometro nella zona di riflusso durante l'ebollizione. Questo metodo permette di variare la pressione.

1.4.3. **Metodo della distillazione per la temperatura di ebollizione**

Il metodo si basa sulla distillazione del liquido e sulla misura della temperatura di ricondensazione del vapore con determinazione della quantità di distillato.

▼B

1.4.4. **Metodo di Siwoloboff**

Il campione viene riscaldato in una provetta immersa a sua volta nel liquido di un bagno riscaldante. Nella provetta contenente il campione viene introdotto un capillare, chiuso per fusione ad un estremo e contenente una bollicina d'aria nella parte inferiore.

1.4.5. **Determinazione tramite fotocellula**

Si impiega il metodo Siwoloboff, applicando tuttavia la misura fotoelettrica della fase di emissione delle bollicine.

1.4.6. **Analisi termica differenziale**

Questa tecnica registra la differenza di temperatura tra la sostanza e un materiale di riferimento, in funzione della temperatura, mentre la sostanza e il materiale di riferimento sono sottoposti allo stesso programma controllato di variazione della temperatura. Quando il campione subisce una transizione che implica una variazione di entalpia, tale variazione è indicata da un allontanamento endotermico (ebollizione) dalla linea di base nella registrazione della temperatura.

1.4.7. **Calorimetria differenziale a scansione**

Questa tecnica registra la differenza di energia introdotta in una sostanza e in un materiale di riferimento in funzione della temperatura mentre la sostanza e il materiale di riferimento vengono sottoposti allo stesso programma controllato di variazione della temperatura. Questa energia è l'energia necessaria per mantenere a zero la differenza di temperatura tra la sostanza e il materiale di riferimento. Quando il campione subisce una transizione che implica una variazione di entalpia, tale variazione è indicata da un allontanamento endotermico (ebollizione) dalla linea di base della registrazione del flusso di calore.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

La tabella 1 riporta l'applicabilità e l'accuratezza dei vari metodi utilizzati per la determinazione della temperatura di ebollizione/intervallo di ebollizione.

Tabella 1

Confronto dei metodi

Metodo di misura	Accuratezza stimata	Norme esistenti
Ebulliometro	± 1,4 K (fino a 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (fino a 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Metodo dinamico	± 0,5 K (fino a 600 K) (2)	
Processo di distillazione (intervallo di ebollizione)	± 0,5 k (fino a 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Metodo di Siwoloboff	± 2 K (fino a 600 K) (2)	
Rivelazione mediante fotocellula	± 0,3 K (a 373 K) (2)	
Analisi termica differenziale	± 0,5 K (fino a 600 K) ± 2,0 K (fino a 1 273 K)	ASTM E 537-76
Calorimetria differenziale a scansione	± 0,5 K (fino a 600 K) ± 2,0 K (fino a 1 273 K)	ASTM E 537-76

(1) Questo livello di accuratezza è valido soltanto nel caso di una strumentazione semplice, come ad esempio quella descritta nella norma ASTM D 1120-72; esso può essere migliorato con ebulliometri più perfezionati.
(2) Valida solo per sostanze pure. L'uso in altre circostanze deve essere giustificato.

▼B

1.6. DESCRIZIONE DEI METODI

I procedimenti relativi ad alcuni dei metodi citati sono descritti in varie norme internazionali e nazionali (vedi appendice).

1.6.1. **Ebulliometro**

Vedi appendice.

1.6.2. **Metodo dinamico**

Vedi metodo A.4. per la determinazione della tensione di vapore.

Si assume come temperatura di ebollizione quella misurata in corrispondenza di una pressione di 101,325 kPa.

1.6.3. **Metodo della distillazione (intervallo di ebollizione)**

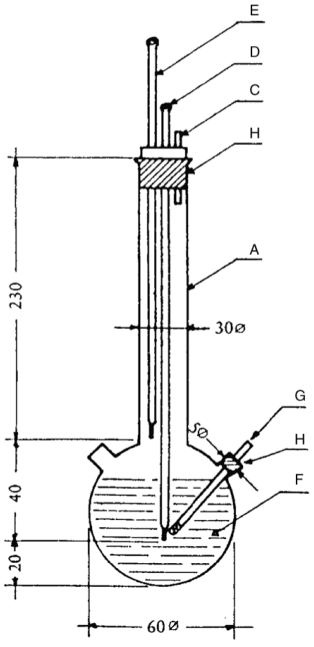
Vedi appendice.

1.6.4. **Metodo di Siwoloboff**

Il campione viene riscaldato in una apparecchiatura per il punto di fusione in una provetta di diametro approssimato di 5 mm (figura 1).

La figura 1 presenta un tipo di apparecchiatura standardizzata per la determinazione della temperatura di fusione e di ebollizione (JIS K 0064) (realizzata in vetro; tutte le quote sono in mm).

Figura 1



A: Recipiente di misura
B: Tappo
C: Sfogo
D: Termometro
E: Termometro ausiliario
F: Bagno liquido
G: Provetta contenente il campione: diametro esterno massimo 5 mm; contenente un tubo capillare di lunghezza di 100 mm circa, diametro interno di 1 mm circa e con spessore della parete da 0,2 a 0,3 mm
H: Tubo laterale

Nella provetta viene posto un tubo capillare (capillare di ebollizione) fuso a circa 1 cm dall'estremità inferiore. Il livello di riempimento della sostanza in esame deve essere tale che la parte fusa del capillare si trovi al di sotto della superficie del liquido. La provetta contenente il capillare di ebollizione può essere assicurata al termometro con un elastico oppure fissata tramite un sostegno laterale (vedi figura 2).

▼B

Figura 2

Principio secondo Siwoloboff

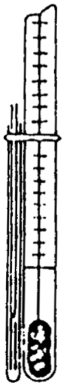
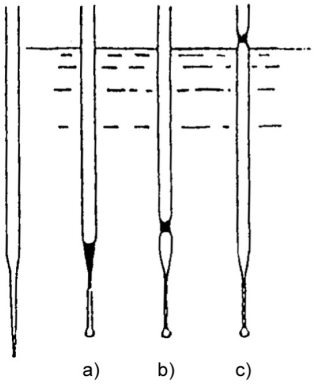


Figura 3

Principio modificato



Il liquido per il bagno va scelto in funzione della temperatura di ebollizione. Per temperature fino a 573 K si può impiegare olio di silicone. La paraffina liquida può essere impiegata solo fino a 473 K. Il riscaldamento del bagno liquido deve essere regolato in modo che l'incremento di temperatura sia inizialmente di circa 3 K/min. Il liquido del bagno va tenuto in agitazione. A circa 10 K al di sotto della temperatura di ebollizione prevista, il riscaldamento va diminuito in maniera da ridurre la velocità di aumento della temperatura a meno di 1 K/min. In prossimità della temperatura di ebollizione, dal capillare in ebollizione incominciano a emergere rapidamente delle bollicine.

La temperatura di ebollizione è la temperatura alla quale, per raffreddamento temporaneo, la serie di bollicine s'arresta e il fluido inizia improvvisamente a risalire nel capillare. La corrispondente lettura termometrica rappresenta la temperatura di ebollizione della sostanza.

Secondo il principio modificato (vedi figura 3) la temperatura di ebollizione viene determinata in un capillare per la temperatura di fusione. Questo viene sfinato per circa 2 cm (a) e con esso si aspira una piccola quantità del campione. L'estremità aperta della parte sfinata viene chiusa alla fiamma in modo da far restare una bollicina d'aria in vicinanza della punta. Durante il riscaldamento nell'apparecchio per la temperatura di fusione (b) la bolla d'aria si dilata. La temperatura di ebollizione corrisponde alla temperatura alla quale il menisco superiore della sostanza raggiunge il livello della superficie del bagno liquido (c).

1.6.5. **Determinazione tramite fotocellula**

Il campione viene riscaldato in un tubicino capillare all'interno di un blocco metallico riscaldante.

Tramite opportune aperture sul blocco, un raggio di luce viene fatto passare attraverso la sostanza e colpisce una fotocellula accuratamente tarata.

Durante l'aumento della temperatura del campione, dal capillare di ebollizione emergono bollicine d'aria isolate. Quando viene raggiunta la temperatura di ebollizione, il numero di bollicine aumenta enormemente. Ciò fa variare l'intensità della luce misurata dalla fotocellula, inviando un segnale di arresto all'indice di un termometro a resistenza di platino collocato nel blocco.

Questo metodo risulta particolarmente vantaggioso poiché permette determinazioni al di sotto della temperatura ambiente fino a 253,15 K (- 20 °C) senza modifiche dell'apparecchiatura. È semplicemente necessario porre lo strumento in un bagno di raffreddamento.

▼B

1.6.6. **Analisi termica**

1.6.6.1. *Analisi termica differenziale*

Vedi appendice

1.6.6.2. *Calorimetria differenziale a scansione*

Vedi appendice

2. **DATI**

Per piccole deviazioni dalla pressione normale (max. ± 5 kPa), le temperature di ebollizione vengono normalizzate a T_n mediante la seguente equazione numerica di Sidney-Young:

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

dove:

Δp = (101,325 — p) [notare il segno],

p = valore misurato della pressione, in kPa,

f_T = coefficiente di correzione della temperatura di ebollizione con la pressione, in K/kPa,

T = valore misurato della temperatura, in K,

T_n = temperatura di ebollizione corretta a pressione normale, in K.

Per molte sostanze i coefficienti di correzione della temperatura f_T e le equazioni per il calcolo approssimativo sono indicati nelle norme internazionali e nazionali prima citate.

A titolo di esempio, il metodo DIN 53171 cita i seguenti coefficienti approssimativi per i solventi contenuti nelle vernici:

Tabella 2

Coefficienti di correzione della temperatura f_T

Temperatura T in K	Coefficiente di correzione f_T (K/kPa
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

▼B

3. **RELAZIONE**

La relazione sulla prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— metodo usato;

— descrizione precisa della sostanza (identità e impurezze) e dell'eventuale stadio preliminare di purificazione;

— una stima dell'accuratezza.

Come temperatura di ebollizione viene riportata la media di almeno due misure che ricadano nel campo dell'accuratezza stimata (vedi tabella 1).

Devono essere riportate le temperature di ebollizione misurate e la loro media, e le pressioni alle quali sono state effettuate le misure devono essere riportate in kPa. La pressione deve preferibilmente essere prossima alla normale pressione atmosferica.

Vanno fornite tutte le informazioni e osservazioni utili per l'interpretazione dei risultati, in particolare per quanto riguarda le impurezze e lo stato fisico della sostanza.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OCDE, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) IUPAC, B. le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VIII.

▼B

Appendice

Per ulteriori particolari tecnici, si possono ad esempio consultare le seguenti norme:

1. **Ebulliometro**

ASTM D 1120-72	Standard test method for boiling point of engine anti-freezes

2. **Metodo della distillazione (intervallo di ebollizione)**

ISO/R 918	Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/71	Method for the determination of distillation characteristics
DIN 53171	Lösungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **Analisi termica differenziale e calorimetria differenziale a scansione**

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse: Begriffe

▼B

A.3. DENSITÀ RELATIVA

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. I metodi di prova internazionali equivalenti o altri metodi di prova applicabili per l'endpoint in questione figurano nella tabella 1 della parte 0.

▼M1

A.4. TENSIONE DI VAPORE

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. I metodi di prova internazionali equivalenti o altri metodi di prova applicabili per l'endpoint in questione figurano nella tabella 1 della parte 0.

▼B

A.5. TENSIONE SUPERFICIALE

1. METODO

I metodi descritti si basano sulle linee direttrici OCSE (1) I principi fondamentali sono presentati nel riferimento (2).

1.1. INTRODUZIONE

I metodi qui illustrati si applicano alla misura della tensione superficiale di soluzioni acquose.

Prima di effettuare le prove, è utile disporre di dati preliminari su alcune caratteristiche della sostanza in esame, quali la solubilità in acqua, la struttura, il comportamento all'idrolisi e la concentrazione critica per la formazione di micelle.

I metodi qui illustrati si applicano alla maggior parte delle sostanze chimiche senza alcuna limitazione rispetto al loro grado di purezza.

La misura della tensione superficiale col metodo del tensiometro ad anello può essere effettuata soltanto su soluzioni acquose con viscosità dinamica inferiore a 200 mPa s circa.

1.2. DEFINIZIONI ED UNITÀ

Per tensione superficiale si intende l'entalpia libera superficiale per unità di area.

La tensione superficiale si misura in:

N/m (unità SI) oppure in

mN/m (sottomultipli della unità SI);

1 N/m = 10^3 dine/cm,

1 mN/m = 1 dine/cm nel vecchio sistema cgs.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Non è necessario utilizzare sostanze di riferimento ogni volta che si esamina una nuova sostanza. Esse servono principalmente per controllare periodicamente l'attendibilità del metodo e per permettere il confronto dei risultati ottenuti con altri metodi.

Nei riferimenti bibliografici (1) e (3) sono citate varie sostanze di riferimento in grado di coprire un ampio campo di valori della tensione superficiale.

1.4. PRINCIPIO DEI METODI

I metodi si basano sulla misura della massima forza che è necessario esercitare in senso verticale ad una staffa o ad un anello a contatto con la superficie del liquido in esame posto in un recipiente di misura affinché detto liquido si distacchi dalla superficie stessa, ovvero ad una lamina che abbia un bordo a contatto con la superficie suddetta per sollevare la pellicola che si è formata.

Le sostanze che sono solubili in acqua ad una concentrazione di almeno 1 mg/l sono esaminate in soluzione acquosa ad un'unica concentrazione.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

I metodi descritti permettono misure più precise di quanto possa essere necessario per valutazioni di ordine ambientale.

▼B

1.6. DESCRIZIONE DEI METODI

Si prepara una soluzione della sostanza in acqua distillata. La concentrazione di questa soluzione dovrebbe essere il 90 % del valore corrispondente alla concentrazione di saturazione della sostanza in acqua; quando questa concentrazione supera 1 g/l, si usa per la prova una concentrazione di 1 g/l. Non è necessario eseguire il saggio su sostanze con una solubilità in acqua minore di 1 mg/1.

1.6.1. **Metodo della lamina**

Vedi ISO 304 e NF T 73-060 (Tensioattivi — Determinazione della tensione superficiale attraverso il sollevamento di pellicole liquide).

1.6.2. **Metodo della staffa**

Vedi ISO 304 e NF T 73-060 (Tensioattivi — Determinazione della tensione superficiale attraverso il sollevamento di pellicole liquide).

1.6.3. **Metodo dell'anello**

Vedi ISO 304 e NF T 73-060 (Tensioattivi — Determinazione della tensione superficiale attraverso il sollevamento di pellicole liquide).

1.6.4. **Metodo armonizzato dell'anello secondo l'OCSE**

1.6.4.1. *Apparecchiatura*

I tensiometri reperibili in commercio risultano adeguati a questo tipo di misura. Essi consistono delle parti seguenti:

— tavolo mobile per il campione,

— sistema di misurazione della forza,

— elemento di misura (anello),

— recipienti di misura.

1.6.4.1.1. Tavolo mobile per il campione

Il tavolo mobile per il campione viene usato come piano d'appoggio per il recipiente di misura termostatato contenente la soluzione in esame. Detto tavolo è montato su di un sostegno assieme al sistema di misurazione della forza.

1.6.4.1.2. Sistema di misurazione della forza

Il sistema di misurazione della forza (vedi la figura) è collocato al di sopra del tavolo che sostiene il campione. L'errore nella misura della forza non deve essere maggiore di $\pm 10^{-6}$N, corrispondente ad un limite d'errore di ± 0,1 mg in unità di massa. Nella maggioranza dei casi, la scala di misura dei tensiometri reperibili in commercio è tarata in mN/m, in modo che la tensione superficiale possa essere direttamente letta in mN/m con una incertezza di 0,1 mN/m.

▼B

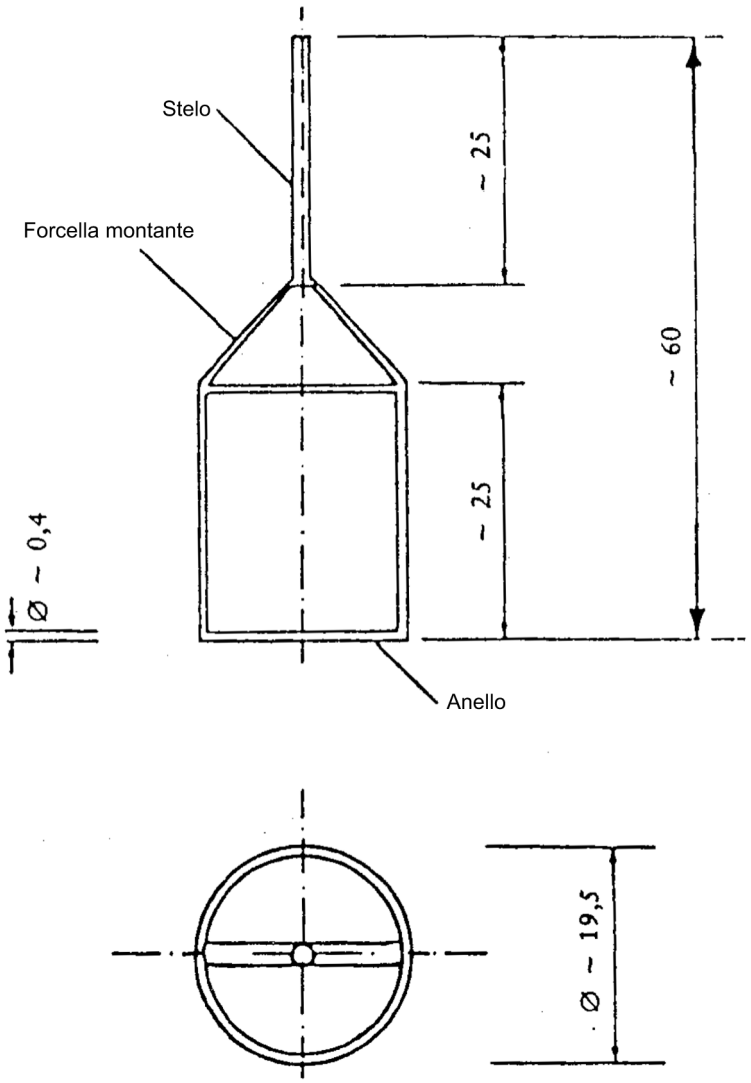
1.6.4.1.3. Elemento di misura (anello)

L'anello è generalmente costituito da un filo di platino-iridio di circa 0,4 mm di spessore ed avente una circonferenza media di 60 mm. L'anello è sospeso orizzontalmente ad uno stelo metallico e ad una forcella di supporto in filo metallico che costituiscono il collegamento con il sistema di misurazione della forza (vedi la figura).

Figura

Elemento di misura

(Tutte le quote sono in mm)



1.6.4.1.4. Recipiente di misura

Il recipiente di misura contenente la soluzione in esame deve essere in vetro e permettere la termostatazione. Esso deve essere progettato in modo che, durante la misura, la temperatura della soluzione liquida in esame e della fase gassosa sovrastante la sua superficie rimanga costante e che il campione non possa evaporare. Sono accettabili recipienti cilindrici in vetro di diametro interno non inferiore a 45 mm.

▼B

1.6.4.2. *Preparazione dell'apparecchiatura*

1.6.4.2.1. Pulizia

I recipienti di vetro devono essere accuratamente puliti. Se necessario, essi vanno lavati con miscela solfo-cromica bollente, poi con acido fosforico sciropposo (dall'83 al 98 % in peso di H_3PO_4), abbondantemente risciacquati con acqua di rubinetto, lavati con acqua bidistillata fino a reazione neutra ed infine asciugati o risciacquati con parte del campione liquido in esame.

L'anello deve essere innanzitutto abbondantemente risciacquato con acqua per eliminare ogni sostanza idrosolubile, poi immerso per breve tempo nella miscela solfo-cromica, lavato con acqua bidistillata fino a reazione neutra ed infine riscaldato brevemente su una fiamma a metanolo.

Nota:

Eventuali sostanze contaminanti che non possano essere disciolte o distrutte dalla miscela solfo-cromica o dall'acido fosforico, come ad esempio siliconi, vanno eliminate mediante un opportuno solvente organico.

1.6.4.2.2. Taratura dell'apparecchio

La convalida dell'apparecchiatura consiste nel controllo del punto di zero e nella regolazione dello strumento in modo che esso permetta determinazioni attendibili in mN/ra.

Montaggio:

La base dell'apparecchio deve essere posta perfettamente in piano, per esempio utilizzando una livella a bolla d'aria e regolando le apposite viti di livellamento.

Azzeramento dell'apparecchio:

Dopo aver montato l'anello sull'apparecchio e prima di immergerlo nel liquido, il tensiometro deve essere azzerato, controllando inoltre il parallelismo dell'anello con la superficie della soluzione. A tale scopo la superficie della soluzione può essere usata come uno specchio.

Taratura:

La taratura può essere effettuata tramite uno dei due procedimenti seguenti:

a) per mezzo di una massa: il procedimento si basa sull'impiego di cavalieri di massa nota compresa tra 0,1 e 1,0 g, da collocare sull'anello. Il fattore di calibrazione Φ_a, per il quale tutte le letture dell'apparecchio devono essere moltiplicate, va determinato con la seguente equazione (1):

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

dove:

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

m = massa del cavaliere (in g),

g = accelerazione di gravità (981 $cm.s^{-2}$ al livello del mare),

b = circonferenza dell'anello (in cm),

σ_a = lettura al tensiometro dopo collocamento del cavaliere sull'anello (in mN/m);

▼B

b) per mezzo dell'acqua: il procedimento si basa sull'impiego di acqua pura, la cui tensione superficiale è nota; per esempio, a 23 °C essa è di 72,3 mN/m. Questo metodo è più rapido della taratura con pesi, ma comporta sempre il rischio che la tensione superficiale dell'acqua risulti alterata a causa della contaminazione con tensioattivi in traccia.

Il fattore di taratura Φ_b, per il quale tutte le letture dell'apparecchio devono essere moltiplicate, va determinato con la seguente equazione (2):

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

dove:

σ_o = valore riportato in letteratura per la tensione superficiale dell'acqua (in mN/m),

σ_g = valore misurato della tensione superficiale dell'acqua (in mN/m) entrambi riferiti alla stessa temperatura.

1.6.4.3. *Preparazione dei campioni*

Vanno preparate soluzioni acquose delle sostanze da esaminare alle concentrazioni richieste ed in assenza di alcun corpo di fondo.

La soluzione deve essere mantenuta a temperatura costante (± 0,5°C). Poiché la tensione superficiale di una soluzione nel recipiente di misura varia con il tempo, devono essere effettuate più misure a distanza l'una dall'altra, in modo da poter tracciare un grafico rappresentante le variazioni della tensione superficiale in funzione del tempo. Lo stato di equilibrio si considera raggiunto quando non si riscontrano più variazioni.

La polvere e la contaminazione gassosa ad opera di altre sostanze interferiscono con le misure. Queste devono pertanto essere effettuate sotto una copertura di protezione.

1.6.5. **Condizioni sperimentali**

Le misure vanno eseguite a 20 °C circa con variazioni non superiori a ± 0,5°C.

1.6.6. **Esecuzione della prova**

Le soluzioni da sottoporre a misura devono essere trasferite nel recipiente di misura accuratamente pulito, avendo cura di evitare la formazione di schiuma, e successivamente il recipiente di misura va collocato sul tavolo dell'apparecchio di prova. Il piano dei tavolo va alzato insieme ai recipiente fino ad immergere l'anello sotto la superficie della soluzione in esame. Il piano del tavolo va poi abbassato gradualmente ed uniformemente (ad una velocità di circa 0,5 cm/min), in modo da staccare l'anello dalla superficie, fino a raggiungere il massimo della forza. Lo strato liquido attaccato all'anello non deve separarsi da esso. Al termine della misura, l'anello va nuovamente immerso sorto la superficie della soluzione ed il procedimento ripetuto finché si ottenga un valore costante della tensione superficiale. In ciascuna determinazione va registrato il tempo trascorso dal trasferimento della soluzione nel recipiente di misura. Le letture devono essere effettuate in corrispondenza dello sforzo massimo necessario per distaccare l'anello dalla superficie del liquido.

▼B

2. **DATI**

Per calcolare la tensione superficiale, il valore in mN/m letto sull'apparecchio va innanzitutto moltiplicato per il fattore di calibrazione Φ_a o Φ_b, (secondo il procedimento di taratura adottato). Si otterrà così un valore approssimativo, che deve essere a sua volta opportunamente corretto.

Harkins e Jordan (4) hanno determinato alcuni fattori di correzione empirici per i valori della tensione superficiale misurata col metodo dell'anello, i quali dipendono dalle dimensioni dell'anello, dalla densità del liquido e dalla sua tensione superficiale.

Poiché la determinazione del fattore di correzione con le tabelle di Harkins e Jordan per ciascuna singola misura di tensione superficiale risulta troppo laboriosa, per le soluzioni acquose può applicarsi un metodo semplificato, consistente nel desumere la tensione superficiale corretta direttamente dalla tabella qui di seguito riportata (per valori compresi tra quelli tabulati si può ricorrere all'interpolazione).

Tabella

Correzione dei valori sperimentali della tensione superficiale

Valida soltanto per soluzioni acquose con p = 1 g/cm^3

R	= 9,55 mm (raggio medio dell'anello).
r	= 0,185 mm (spessore medio del filo metallico).

Valore sperimentale (mN/m)	Valore corretto (mN/m)	
	Taratura con pesi (vedi punto 1.6.4.2.2, lettera a)	Taratura con acqua (vedi punto 1.6.4.2.2, lettera b)
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9

▼B

Valore sperimentale (mN/m)	Valore corretto (mN/m)	
	Taratura con pesi (vedi punto 1.6.4.2.2, lettera a)	Taratura con acqua (vedi punto 1.6.4.2.2, lettera b)
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Questa tabella è stata compilata sulla base della correzione secondo Harkins e Jordan, in modo analogo alla norma DIN 53914 per l'acqua e le soluzioni acquose (densità p = 1 g/cm^3) e per anelli reperibili in commercio aventi dimensioni di R = 9,55 mm (raggio medio dell'anello) e r = 0,185 mm (spessore del filo metallico). La tabella fornisce i valori corretti per le misure di tensione superficiale effettuate dopo taratura con pesi o con acqua.

In alternativa, la tensione superficiale può essere calcolata senza taratura preliminare ricorrendo alla formula seguente:

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

dove:

F = forza misurata al dinamometro al punto di rottura della pellicola,

R = raggio dell'anello,

f = fattore di correzione (1).

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione di prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— metodo usato;

— tipo d'acqua o soluzione impiegata;

— descrizione precisa della sostanza (identità e impurezze);

— risultati delle misure: tensione superficiale (lettura), indicando sia le singole letture e la loro media che la media corretta (tenendo conto del fattore specifico dell'apparecchio e della tabella di correzione);

▼B

— concentrazione della soluzione;

— temperatura di esecuzione delle prove;

— età della soluzione impiegata; in particolare il tempo trascorso tra la preparazione della soluzione e le misure;

— descrizione della variazione della tensione superficiale col tempo dopo il trasferimento della soluzione nel recipiente di misura;

— tutte le informazioni e osservazioni utili per l'interpretazione dei risultati, in particolare per quanto riguarda le impurezze e lo stato fisico della sostanza.

3.2. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Considerando che l'acqua distillata ha una tensione superficiale di 72,75 mN/m a 20 °C, le sostanze che presentano una tensione superficiale minore di 60 mN/m nelle condizioni di misura previste da questo metodo devono essere considerate come materiali tensioattivi.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Chapter XIV, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, Vol. I, Part I.

(3) Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, 511.

(4) Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc, 1930, vol. 52, 1751.

▼M4

A.6. **IDROSOLUBILITÀ**

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova equivale alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 105 (1995) Questo metodo di prova è una versione riveduta della linea guida originale n. 105 adottata nel 1981. Non vi sono differenze significative tra l'attuale versione e quella del 1981, in quanto è stato modificato soprattutto il formato. La revisione si basa sul metodo di prova dell'UE «Idrosolubilità» ([1]).

CONSIDERAZIONI INIZIALI

2. L'idrosolubilità di una sostanza può essere considerevolmente alterata dalla presenza di impurità. Il presente metodo di prova riguarda la determinazione dell'idrosolubilità di sostanze fondamentalmente pure che sono stabili in acqua e non volatili. Prima di determinare l'idrosolubilità è utile disporre di alcune informazioni preliminari sulla sostanza in esame, come la formula strutturale, la tensione di vapore, la costante di dissociazione e l'idrolisi in funzione del pH.

3. In questo capitolo sono descritti due metodi: il metodo dell'eluizione su colonna e il metodo del matraccio che riguardano rispettivamente solubilità inferiori e superiori a 10^{-2} g/l. Viene anche descritta una semplice prova preliminare che consente di determinare approssimativamente la quantità adeguata di campione da utilizzare nella prova finale e il tempo necessario per raggiungere la saturazione.

DEFINIZIONI E UNITÀ

4. L'idrosolubilità di una sostanza è la concentrazione massica di saturazione della sostanza in acqua ad una determinata temperatura.

5. L'idrosolubilità è espressa in massa di soluto per volume di soluzione. L'unità SI è kg/m^3 (ma si può anche far uso di g/l).

SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

6. Per questo metodo non è necessario utilizzare sostanze chimiche di riferimento quando si esamina una sostanza.

DESCRIZIONE DEI METODI

Condizioni sperimentali

7. La prova deve essere preferibilmente effettuata a 20 ± 0,5 °C, mantenendo costante la temperatura scelta in tutte le parti dell'apparecchiatura.

Prova preliminare

8. Nell'ambito di una procedura in più fasi successive (stepwise), in un cilindro graduato da 10 ml con tappo di vetro vengono versati volumi crescenti di acqua a temperatura ambiente su circa 0,1 g di campione (le sostanze in esame solide devono essere polverizzate). Dopo ciascuna aggiunta di acqua, la miscela viene agitata per 10 minuti e controllata visivamente per verificare la presenza di particelle non disciolte del campione. Se, dopo l'aggiunta di

▼M4

10 ml d'acqua, il campione, o parte di esso, resta indisciolto, l'esperimento deve essere proseguito in un cilindro graduato da 100 ml. La solubilità approssimativa è indicata nella tabella 1 in corrispondenza del volume d'acqua necessario per ottenere la dissoluzione completa del campione. Quando la solubilità è bassa, può occorrere più tempo per sciogliere la sostanza in esame e si devono prevedere almeno 24 ore. Se dopo 24 ore la sostanza in esame non è ancora disciolta, occorre aspettare più a lungo (fino a 96 ore) o tentare un'ulteriore diluizione per stabilire se occorre utilizzare il metodo di eluizione su colonna o il metodo del matraccio.

Tabella 1

ml di acqua per 0,1 g di campione	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
solubilità approssimativa in g/l	> 1 000	Da 1 000 a 200	Da 200 a 100	Da 100 a 50	Da 50 a 10	Da 10 a 1	< 1

Metodo dell'eluizione su colonna

Principio

9. Questo metodo si basa sull'eluizione della sostanza in esame con acqua in una microcolonna caricata con un materiale di supporto inerte, precedentemente rivestito con un eccesso della sostanza stessa (2). L'idrosolubilità è data dalla concentrazione massica dell'eluato quando questo ha raggiunto un plateau in funzione del tempo.

Apparecchiatura

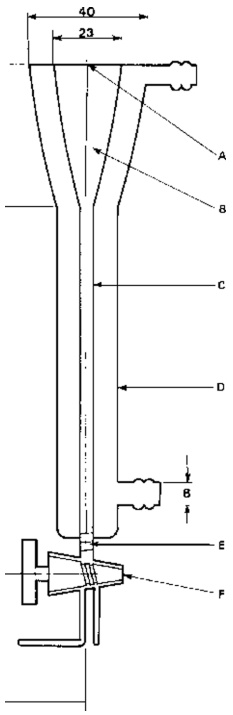
10. L'apparecchiatura è costituita da una microcolonna (figura 1) mantenuta a temperatura costante, collegata ad una pompa di ricircolo (figura 2) o a un recipiente di livellamento (figura 3). La microcolonna contiene un supporto inerte tenuto fermo da un piccolo tampone di lana di vetro che serve anche per filtrare le particelle. Il materiale di supporto può essere costituito da perline di vetro, farina fossile o altri materiali inerti.

11. La microcolonna di cui alla figura 1 è adatta alla configurazione con la pompa di ricircolo. È caratterizzata da uno spazio di testa pari ad almeno cinque volte il volume di letto (eliminato all'inizio dell'esperimento) e il volume di cinque campioni (eliminati dall'analisi nel corso dell'esperimento). In alternativa, le dimensioni possono essere ridotte se è possibile aggiungere acqua nel corso dell'esperimento per sostituire i primi cinque volumi di letto, scartati perché contenenti impurità. La colonna è collegata con giunti in materiale inerte alla pompa di ricircolo, che consente una velocità di flusso pari a circa 25 ml/h. La pompa di ricircolo può essere, ad esempio, una pompa peristaltica o a membrana. Occorre fare in modo che non ci sia contaminazione e/o adsorbimento con il materiale del tubo.

12. La rappresentazione schematica di una configurazione con recipiente di livellamento è riportata nella figura 3. In questa configurazione la microcolonna è munita di un rubinetto ad una via. Il collegamento con il recipiente di livellamento consiste in un giunto di vetro smerigliato e un tubo in materiale inerte. La velocità del flusso proveniente dal recipiente di livellamento deve essere pari a circa 25 ml/h.

▼**M4**

Figura 1



Dimensioni in mm

A. Connessione per giunto di vetro smerigliato

B. Spazio di testa

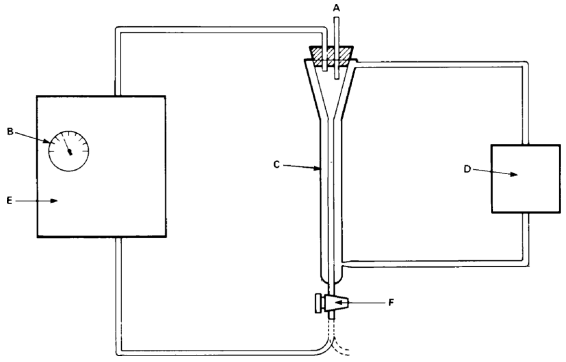
C. Diametro interno 5

D. Diametro esterno 19

E. Tampone di lana di vetro

F. Rubinetto

Figura 2



A. Equilibrio atmosferico

B. Flussimetro

C. Microcolonna

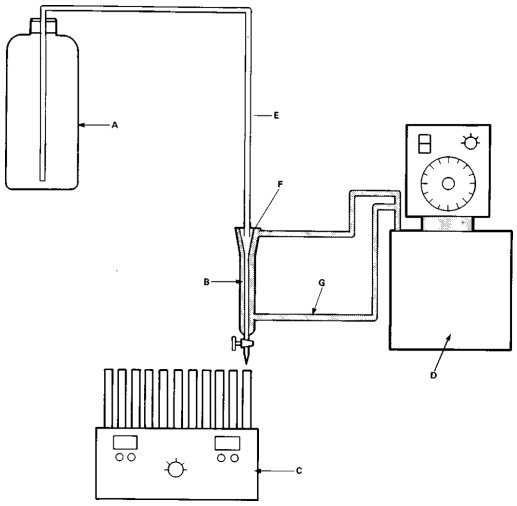
D. Pompa di circolazione termocontrollata

E. Pompa di ricircolo

F. Valvola a due vie per il campionamento

▼M4

Figura 3



A. Recipiente di livellamento (per esempio bottiglia da 2,5 litri)

B. Colonna

C. Collettore di frazione

D. Termostato

E. Tubo in teflon

F. Giunto in vetro smerigliato

G. Tubi per l'acqua (tra il termostato e la colonna, diametro interno 8 mm circa)

13. Circa 600 mg del materiale di supporto sono trasferiti in un matraccio da 50 ml. Una quantità adeguata della sostanza in esame è sciolta in un solvente volatile di purezza analitica e una quantità adeguata di questa soluzione viene aggiunta al materiale di supporto. Il solvente è completamente evaporato, utilizzando ad esempio un evaporatore rotante, perché altrimenti non si ottiene la saturazione dell'acqua del supporto nel corso della fase di eluizione per via della partizione in superficie. Il materiale di supporto così impregnato viene lasciato a bagno per due ore in 5 ml circa di acqua, e quindi la sospensione viene versata nella microcolonna. Altrimenti, si può versare il materiale di supporto impregnato a secco nella microcolonna riempita di acqua lasciando poi il tutto a riposo per due ore per raggiungere l'equilibrio.

14. Il caricamento del materiale di supporto può causare problemi, dando luogo a risultati erronei, se la sostanza di prova si deposita sotto forma di olio. Occorre valutare questi problemi e riportare i dettagli nella relazione.

Procedura con pompa di ricircolo

15. Si avvia il flusso attraverso la colonna. Si raccomanda di usare un flusso di approssimativamente 25 ml/h (che corrisponde a 10 volte il volume di letto della colonna descritta per ora). Per eliminare le impurità solubili in acqua, si devono scartare almeno i primi cinque volumi di letto. Successivamente si attiva la pompa fino al raggiungimento dell'equilibrio, che è dimostrato da cinque campioni successivi, le cui concentrazioni non differiscono tra loro più del ± 30 % in una distribuzione casuale. Questi campionamenti devono essere separati l'uno dall'altro da intervalli di tempo corrispondenti almeno al passaggio di un volume corrispondente a dieci volte il volume di letto della colonna. In funzione del metodo analitico utilizzato, può risultare preferibile stabilire una curva concentrazione/tempo per evidenziare che è stato raggiunto l'equilibrio.

▼M4

Procedura con recipiente di livellamento

16. Vanno prelevate ed analizzate con il metodo prescelto frazioni di eluato successive. Per determinare la solubilità si utilizzano le frazioni provenienti dalla fase centrale di eluizione, dove le concentrazioni sono costanti (con uno scarto masso di ± 30 %) in almeno cinque frazioni consecutive.

17. L'eluente più indicato è l'acqua bidistillata, ma si può utilizzare anche acqua deionizzata, caratterizzata da una resistività superiore a 10 megaohm/cm e un tenore totale di carbonio organico inferiore a 0,01 %.

18. Nell'ambito di entrambe le procedure, l'operazione viene ripetuta una seconda volta dimezzando la velocità di flusso. Se i risultati delle due operazioni concordano, la prova è riuscita. Se la solubilità misurata è superiore con il flusso inferiore, occorre proseguire con il dimezzamento del flusso fino a quando due serie successive non forniscano lo stesso valore di solubilità.

19. Nell'ambito di entrambe le procedure, occorre esaminare le frazioni per controllare la presenza di materiale colloidale mediante l'esame dell'effetto Tyndall. La presenza di particelle invalida la prova che deve essere ripetuta dopo aver migliorato l'azione filtrante della colonna.

20. Occorre misurare il pH di ogni campione, preferibilmente utilizzando cartine indicatrici speciali.

Metodo del matraccio

Principio

21. La sostanza in esame (polverizzata, se solida) è disciolta in acqua a una temperatura leggermente superiore alla temperatura di prova. Quando viene raggiunta la saturazione, la miscela viene raffreddata e mantenuta alla temperatura di prova. In alternativa, la misurazione può essere eseguita direttamente alla temperatura di prova se, mediante un appropriato campionamento, si è sicuri di avere raggiunto l'equilibrio di saturazione. Successivamente, si determina mediante un metodo analitico adeguato la concentrazione massica della sostanza in esame nella soluzione acquosa che non deve contenere particelle indisciolte (3).

Apparecchiatura

22. Occorre il materiale seguente:

— normale strumentazione e vetreria da laboratorio,

— un apparecchio per l'agitazione delle soluzioni a temperatura costante controllata,

— se necessario per le emulsioni, una centrifuga (preferibilmente termostatata), e

— apparecchiatura analitica.

Procedura

23. Sulla base della prova preliminare viene valutata la quantità di sostanza necessaria per saturare il volume di acqua stabilito. Una quantità di sostanza pari a cinque volte la suddetta quantità viene pesata direttamente in tre recipienti di vetro (per esempio, provette da centrifuga, matracci) provvisti di tappi di vetro. In ciascun recipiente viene aggiunto un volume d'acqua, scelto in funzione del metodo analitico e del «range» di solubilità. I recipienti sono chiusi ermeticamente e poi agitati a 30 °C. Si deve utilizzare un apparecchio di agitazione o di mescolamento che funzioni a temperatura costante, per esempio un agitatore magnetico in un bagnomaria termostatato.

▼M4

Dopo un giorno, uno dei recipienti viene equilibrato per 24 ore alla temperatura di prova, con agitazione saltuaria. Il contenuto del recipiente viene successivamente centrifugato alla temperatura di prova, e viene misurata, con un opportuno metodo analitico, la concentrazione della sostanza in esame nella fase acquosa limpida. Gli altri due matracci vengono trattati in modo analogo dopo un'equilibrazione iniziale a 30 °C per due e tre giorni, rispettivamente. Se le concentrazioni misurate almeno negli ultimi due recipienti non divergono di più del 15 %, la prova è riuscita. Se invece i risultati relativi ai recipienti 1, 2 e 3 evidenziano una tendenza verso valori crescenti, l'intera prova deve essere ripetuta utilizzando tempi di equilibrazione più lunghi.

24. La prova può essere effettuata anche senza la preincubazione a 30 °C. Per calcolare la velocità con cui si raggiunge l'equilibrio di saturazione, si prelevano dei campioni fino a quando il tempo di agitazione non influisce più sulle concentrazioni.

25. Occorre misurare il pH di ogni campione, preferibilmente utilizzando cartine indicatrici speciali.

Determinazioni analitiche

26. Per queste determinazioni è preferibile ricorrere a un metodo analitico specifico per la sostanza in esame, poiché piccole quantità di impurità solubili possono causare grandi errori nella misura della solubilità. Esempi di metodi sono: gascromatografia, cromatografia liquida, titolazione, fotometria e voltammetria.

DATI E RELAZIONE

Dati

Metodo dell'eluizione su colonna

27. Per ciascuna serie si deve calcolare il valore medio di almeno cinque campioni consecutivi, prelevati in corrispondenza del plateau di saturazione, nonché la deviazione standard. I valori medi ottenuti in due prove con velocità di flusso diverse non devono divergere di oltre il 30 %.

Metodo del matraccio

28. Occorre calcolare la media dei risultati ottenuti da ognuno dei tre matracci, che tra loro non deve differire di più del 15 %.

Relazione sulla prova

Metodo dell'eluizione su colonna

29. La relazione deve contenere le seguenti informazioni:

— risultati della prova preliminare,

— identità chimica e impurità (tappa di purificazione preliminare, se del caso),

— concentrazioni, flussi e pH individuali di ciascun campione,

— medie e deviazioni standard di almeno cinque campioni dal plateau di saturazione per ciascuna serie,

— media di almeno due serie successive,

— temperatura dell'acqua durante il processo di saturazione,

— metodo di analisi utilizzato,

— natura del materiale di supporto,

— impregnazione del materiale di supporto,

— solvente utilizzato,

— indicazione di un'eventuale instabilità chimica della sostanza durante la prova,

— tutte le informazioni attinenti all'interpretazione dei risultati, in particolare per quanto riguarda le impurità e lo stato fisico della sostanza in esame.

▼M4

Metodo del matraccio

30. La relazione deve contenere le seguenti informazioni:

— risultati della prova preliminare,

— identità chimica e impurità (tappa di purificazione preliminare, se del caso),

— singole determinazioni analitiche e rispettivo valore medio nel caso sia stato determinato più di un valore per ciascun matraccio,

— pH di ciascun campione,

— media dei valori per vari matracci i cui risultati siano concordanti,

— temperatura di prova,

— metodo analitico,

— indicazione di un'eventuale instabilità chimica della sostanza durante la prova,

— tutte le informazioni utili per l'interpretazione dei risultati, in particolare per quanto riguarda le impurità e lo stato fisico della sostanza in esame.

BIBLIOGRAFIA

(1) Direttiva 92/69/CEE della Commissione, del 31 luglio 1992, recante diciassettesimo adeguamento al progresso tecnico della direttiva 67/548/CEE del Consiglio concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose (GU L 383 del 29.12.1992, pag. 113).

(2) NF T 20-045 (AFNOR) (settembre 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility — Column elution method.

(3) NF T 20-046 (AFNOR) (settembre 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility — Flaskmethod.

▼B

A.8. COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. I metodi di prova internazionali equivalenti o altri metodi di prova applicabili per l'endpoint in questione figurano nella tabella 1 della parte 0.

▼B

A.9. PUNTO D'INFIAMMABILITÀ

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. I metodi di prova internazionali equivalenti o altri metodi di prova applicabili per l'endpoint in questione figurano nella tabella 1 della parte 0.

▼B

A.10. INFIAMMABILITÀ (SOLIDI)

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. I metodi di prova internazionali equivalenti o altri metodi di prova applicabili per l'endpoint in questione figurano nella tabella 1 della parte 0.

▼B

A.11. INFIAMMABILITÀ (GAS)

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. I metodi di prova internazionali equivalenti o altri metodi di prova applicabili per l'endpoint in questione figurano nella tabella 1 della parte 0.

▼B

A.12. INFIAMMABILITÀ (CONTATTO CON L'ACQUA)

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. I metodi di prova internazionali equivalenti o altri metodi di prova applicabili per l'endpoint in questione figurano nella tabella 1 della parte 0.

▼B

A.13. **PROPRIETÀ PIROFORICHE DI SOLIDI E LIQUIDI**

▼M11

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. I metodi di prova internazionali equivalenti o altri metodi di prova applicabili per gli endpoint in questione figurano nella tabella 1 della parte 0.

▼B

A.14. PROPRIETÀ ESPLOSIVE

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

Il metodo fornisce uno schema di prove per determinare se una sostanza solida o pastosa presenti un pericolo di esplosione quando viene sottoposta all'effetto di una fiamma (sensibilità termica) o ad urti o sfregamenti (sensibilità agli stimoli meccanici) e se una sostanza liquida presenti un pericolo di esplosione quando viene sottoposta all'effetto di una fiamma o di un urto.

Il metodo comprende tre parti:

a) una prova di sensibilità termica (1);

b) una prova di sensibilità meccanica relativa agli urti (1);

c) una prova di sensibilità meccanica relativa allo sfregamento (1).

Il metodo fornisce dei dati per valutare la probabilità che certe sollecitazioni comuni possano dar luogo ad una esplosione. Il metodo non è previsto per stabilire se una sostanza sia in grado di esplodere in qualsiasi condizione.

Il metodo è appropriato per determinare se una sostanza presenti un pericolo di esplosione (sensibilità termica e meccanica) nelle particolari condizioni specificate nella direttiva. Questo metodo è basato su un certo numero di tipi di apparecchi ampiamente usati a livello internazionale (1) e che danno normalmente dei risultati significativi. Si riconosce che il metodo non è definitivo. Apparecchi alternativi a quelli specificati possono essere usati purché siano internazionalmente riconosciuti e i risultati possano adeguatamente venire correlati con quelli ricavabili dall'apparecchio specificato.

Non è necessario eseguire le prove quando le informazioni termodinamiche disponibili (ad esempio il calore di formazione, calore di decomposizione) e/o l'assenza di certi gruppi reattivi (2) nella formula di struttura permettano di stabilire al di là di ogni ragionevole dubbio che la sostanza non è soggetta a rapida decomposizione con sviluppo di gas o liberazione di calore (cioè che il materiale non presenta alcun rischio di esplosione). Per i liquidi non è richiesto un saggio di sensibilità allo sfregamento.

1.2. DEFINIZIONI E UNITÀ

Esplosivi:

Sostanze che possono esplodere sotto l'effetto di una fiamma o che sono sensibili agli urti o all'attrito nell'apparecchiatura specificata (o che presentano una sensibilità meccanica maggiore dell'1,3-dinitrobenzene in un apparecchio alternativo).

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

1,3-dinitrobenzene tecnico cristallino passante un setaccio da 0,5 mm per il metodo dello sfregamento e dell'urto.

Peridro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX, esogeno, ciclonite — CAS 121-82-4), ricristallizzata da cicloesanone acquoso, setacciata a umido attraverso un setaccio da 250 μm e trattenuta su un setaccio da 150 μm, essiccata a 103 ± 2 °C (per 4 ore) per la seconda serie di prove di sfregamento e urto.

▼B

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

Per stabilire le condizioni di sicurezza per l'esecuzione delle tre prove di sensibilità sono necessarie delle prove preliminari.

1.4.1. **Prove di sicurezza di manipolazione (3)**

Per ragioni di sicurezza, prima di eseguire le prove principali campioni molto piccoli (circa 10 mg) della sostanza vengono sottoposti a riscaldamento senza restrizioni fisiche in una fiamma gassosa, ad urti in qualunque tipo di apparecchio adatto e allo sfregamento con l'impiego di un mazzuolo contro un incudine o qualsiasi altro tipo di macchina che produca attrito. Obiettivo della prova è di stabilire se la sostanza sia sensibile ed esplosiva in misura tale che le prove di sensibilità prescritte, in particolare quella della sensibilità termica, debbano essere eseguite con precauzioni particolari per evitare danni all'operatore.

1.4.2. **Sensibilità termica**

Il metodo prevede di riscaldare la sostanza in un tubo d'acciaio chiuso con piastre forate di differente diametro del foro per determinare se la sostanza tenda ad esplodere nelle condizioni di intensa sollecitazione termica e delimitazione spaziale definita.

1.4.3. **Sensibilità meccanica (urti)**

Il metodo prevede di sottoporre la sostanza all'urto di una massa specificata lasciata cadere da un'altezza specificata.

1.4.4. **Sensibilità meccanica (sfregamento)**

Il metodo prevede di sottoporre le sostanze solide o pastose ad attrito tra superfici standard in condizioni specificate di carico e movimento relativo.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

Non stabiliti.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO

1.6.1. **Sensibilità termica (effetto di una fiamma)**

1.6.1.1. *Apparecchiatura*

L'apparecchiatura è costituita da un tubo d'acciaio non riutilizzabile con il suo dispositivo di chiusura riutilizzabile (figura 1), installato in un dispositivo di riscaldamento e protezione. Ciascun tubo è ottenuto per imbutitura da una lamiera d'acciaio (vedi appendice) e presenta un diametro interno di 24 mm, una lunghezza di 75 mm e uno spessore delle pareti di 0,5 mm. I tubi sono flangiati all'estremità aperta per permetterne la chiusura mediante la piastra forata. Questa è costituita da una piastra forata resistente alle alte pressioni, dotata di un foro centrale, saldamente fissata ad un tubo con un giunto a vite a due parti (dado e collare filettato). Il dado e il collare filettato sono in acciaio al cromo-manganese (vedi appendice) che non genera scintille fino a 800 °C. Le piastre forate hanno uno spessore di 6 mm, sono in acciaio resistente al calore (vedi appendice) e sono disponibili con aperture di vario diametro.

▼B

1.6.1.2. *Condizioni di prova*

Normalmente la sostanza viene controllata cosi come fornita, benché in certi casi, ad esempio se è pressata, colata o altrimenti condensata, possa essere necessario triturarla prima di esaminarla.

Per i solidi, la massa di materiale da usarsi in ciascuna prova viene determinata secondo un procedimento a secco in due stadi. Un tubo tarato viene riempito con 9 cm^3 di sostanza e la sostanza viene compattata con una forza di 80 N applicata alla sezione trasversale totale del tubo. Per ragioni di sicurezza o nei casi in cui la forma fisica del campione possa essere modificata per compressione, si possono usare differenti procedure di riempimento; ad esempio, se la sostanza è molto sensibile all'attrito la pigiatura non è appropriata. Se il materiale è comprimibile, se ne aggiunge dell'altro e lo si pigia fino a che il tubo è riempito fino a 55 mm dal bordo. Si determina la massa totale usata per riempire il tubo fino al livello di 55 mm e se ne aggiungono due ulteriori aliquote, pigiata ciascuna con una forza di 80 N. Poi, secondo le necessità, si aggiunge ulteriore materiale pigiandolo oppure lo si toglie per lasciare il rubo riempito fino a 15 mm dal bordo. Si esegue una seconda prova a secco partendo con una quantità pigiata pari a un terzo della massa totale trovata nella prima prova a secco. Si aggiungono altre due di queste aliquote pigiandole a 80 N e il livello della sostanza nel tubo viene regolato a 15 mm dal bordo mediante l'aggiunta o la sottrazione di materiale secondo le necessità. La quantità di solido usata in ciascuna prova è quella determinata nella seconda prova a secco; il riempimento viene eseguito in tre quantità uguali, compresse ciascuna a 9 cm^3 con la forza necessaria, qualunque essa sia. (Ciò può essere facilitato mediante l'uso di anelli distanziatori.)

I liquidi e i gel sono caricati nel tubo fino ad un'altezza di 60 mm ponendo particolare attenzione con i gel per impedire la formazione di vuoti. Il collare filettato viene fatto scivolare sul tubo dal basso, si inserisce l'appropriato piatto forato e si serra il dado dopo aver applicato un po' di lubrificante a base di disolfuro di molibdeno. È essenziale controllare che non vi sia sostanza intrappolata tra la flangia e la piastra né nella filettatura.

Per il riscaldamento si utilizza propano prelevato da una bombola industriale dotata di regolatore di pressione (60-70 mbar), passandolo attraverso un manometro e distribuendolo in modo uniforme (come indicato dall'osservazione visiva delle fiamme uscenti dai bruciatori) a 4 bruciatori mediante un collettore. I bruciatori sono disposti intorno alla camera di prova come mostrato in figura 1. I quattro bruciatori hanno un consumo totale di circa 3,2 litri di propano al minuto. È possibile usare gas combustibili e bruciatori alternativi, ma la velocità di riscaldamento deve essere quella specificata in figura 3. Per tutte le apparecchiature, si deve controllare periodicamente la velocità di riscaldamento con l'uso di tubi riempiti di dibutilftalato, come indicato in figura 3.

1.6.1.3. *Esecuzione delle prove*

Ciascuna prova viene eseguita fino a quando il tubo si frammenta o è stato riscaldato per 5 minuti. Una prova che dia come risultato la frammentazione del tubo in tre o più pezzi, che in alcuni casi possono essere collegati uno all'altro da sottili strisce di metallo come è illustrato in figura 2, viene valutata come esplosione. Se una prova dà come risultato un minor numero di frammenti o nessuna frammentazione, si considera che non abbia dato luogo ad esplosione.

▼B

Si esegue inizialmente una serie di tre prove con una piastra con orificio da 6,0 mm di diametro e, se non si ottengono esplosioni, si esegue una seconda serie di tre prove con una piastra avente un orificio del diametro di 2,0 mm. Se avviene un'esplosione durante una delle serie di prova non sono necessarie prove ulteriori.

1.6.1.4. *Valutazione*

II risultato della prova è considerato positivo se si verifica un'esplosione in una delle serie di prove sopra descritte.

1.6.2. **Sensibilità meccanica (urti)**

1.6.2.1. *Apparecchiatura (figura 4)*

Le parti essenziali di una tipica apparecchiatura a martello cadente sono un blocco d'acciaio fuso con base, incudine, colonna, guide, pesi cadenti, dispositivo di rilascio e porta campione. L'incudine d'acciaio da 100 mm di diametro per 70 mm di altezza è avvitata su un blocco d'acciaio da 230 mm di lunghezza per 250 mm di larghezza per 200 mm d'altezza con una base fusa da 450 mm di lunghezza per 450 mm di larghezza per 60 mm d'altezza. Sul retro del blocco d'acciaio è avvitato un sostegno nel quale è fissata una colonna in tubo d'acciaio trafilato senza saldatura. Quattro viti ancorano l'apparecchio ad un blocco massiccio di cemento da 60 × 60 × 60 cm in modo che le guide siano assolutamente verticali e il peso cadente possa cadere liberamente. Per l'uso sono disponibili pesi di acciaio massiccio da 5 e 10 kg. La testa di impatto dei pesi è di acciaio temprato da 60 a 63 HRC e presenta un diametro minimo di 25 mm.

Il campione da esaminare viene posto in un dispositivo per prove d'urto costituito da due cilindri massicci d'acciaio coassiali e sovrapposti in un cilindro cavo d'acciaio che funge da guida. I cilindri d'acciaio massiccio devono avere un diametro di 10 (- 0,003, - 0,005) mm e un'altezza di 10 mm e superfici levigate, spigoli arrotondati (raggio di curvatura 0,5 mm) e una durezza HRC da 58 a 65. Il cilindro cavo deve avere un diametro esterno di 16 mm, un foro levigato di 10 (+ 0,005, + 0,010) mm e un'altezza di 13 mm. Il dispositivo per le prove d'urto è montato su un'incudine intermedia d'acciaio (diametro 26 mm, altezza 26 mm) e centrato mediante un anello con fori di sfogo dei fumi.

1.6.2.2. *Condizioni sperimentali*

Il volume del campione dovrebbe essere di 40 mm^3, o un volume adatto per eventuali apparecchi alternativi. Le sostanze solide dovrebbero essere provate allo stato secco e preparate come segue:

a) le sostanze in polvere sono setacciate (maglie da 0,5 mm); per le prove si usa tutto il materiale passato attraverso il setaccio;

b) le sostanze pressate, fuse o altrimenti condensate vengono rotte in pezzettini e setacciate. Per le prove si usa la frazione di setacciatura compresa tra 0,5 e 1 mm di diametro, e questa deve essere rappresentativa della sostanza originale.

Le sostanze che si presentano normalmente sotto forma di pasta dovrebbero essere saggiate per quanto possibile alla stato secco o comunque dopo aver rimosso la maggior quantità possibile di diluente.

▼B

1.6.2.3. *Esecuzione delle prove*

Si esegue una serie di 6 prove lasciando cadere la massa di 10 kg da 0,40 m (40 J). Se durante le sei prove a 40 J si ottiene un'esplosione, si deve eseguire una serie ulteriore di 6 prove lasciando cadere una massa di 5 kg da 0,15 m (7,5 J). In altri apparecchi, il campione viene confrontato con la sostanza di riferimento scelta usando una procedura di provata validità (ad esempio tecnica «su e giù», ecc.).

1.6.2.4. *Valutazione*

Il risultato della prova viene considerato positivo se si verifica un'esplosione (l'accensione violenta e/o un colpo sono equivalenti a un'esplosione) almeno una volta in qualsiasi delle prove con l'apparecchio per prove d'urto specificato oppure se il campione è più sensibile dello 1,3-dinitrobenzene o della RDX in una prova d'urto alternativa.

1.6.3. **Sensibilità meccanica (attrito)**

1.6.3.1. *Apparecchiatura (figura 5)*

L'apparecchiatura per le prove d'attrito è costituita da una piastra di base d'acciaio fuso sulla quale è montato il dispositivo di sfregamento, costituito da una barra fissa di porcellana con una piastra mobile di porcellana. La piastra di porcellana è tenuta in una slitta che corre su due guide. La slitta è collegata ad un motore elettrico mediante un'asta di collegamento, un eccentrico e una trasmissione adatta perché la piastra di porcellana venga spostata, una sola volta, avanti e indietro sotto la barra di porcellana per un tratto di 10 mm. La barra di porcellana può essere sottoposta ad un carico per esempio di 120 o 360 newton.

Le piastre di porcellana piatte sono fatte di porcellana tecnica bianca (ruvidità da 9 a 32 μm) e hanno le seguenti dimensioni: 25 mm di lunghezza × 25 mm di larghezza × 5 mm di altezza. La barra cilindrica di porcellana è fatta anch'essa di porcellana bianca tecnica ed ha una lunghezza di 15 mm, un diametro di 10 mm e superfici terminali sferiche irruvidite con un raggio di curvatura di 10 mm.

1.6.3.2. *Condizioni sperimentali*

Il volume del campione dovrebbe essere di 10 mm^3 o un volume adatto ad eventuale apparecchio alternativo.

Le sostanze solide sono controllate allo stato secco e preparate come segue:

a) le sostanze in polvere sono setacciate (maglie da 0,5 mm); per la prova si utilizza tutto il materiale passato attraverso il setaccio;

b) le sostanze pressate, fuse o altrimenti condensate vengono rotte in pezzettini e setacciate. La frazione di setacciatura < 0,5 mm viene usata per le prove.

Le sostanze che si presentano normalmente sotto forma di pasta devono essere provate per quanto possibile allo stato secco. Se la sostanza non può essere preparata allo stato secco, la pasta (dopo rimozione della maggior quantità possibile di diluente) viene provata in forma di una pellicola da 0,5 mm di spessore, 2 mm di larghezza e 10 mm di lunghezza preparata con un attrezzo opportuno.

▼B

1.6.3.3. *Esecuzione delle prove*

La base di porcellana viene portata sul campione in esame e si applica il peso. Durante l'esecuzione della prova, la struttura spugnosa superficiale della piastra di porcellana deve giacere trasversalmente rispetto alla direzione di movimento. Bisogna fare attenzione che la barra sia appoggiata sul campione, che vi sia una quantità sufficiente di materiale in esame sotto alla barra e inoltre che la piastra si muova correttamente sotto la barra. Per le sostanze pastose si usa un calibro dello spessore di 0,5 mm con una fessura da 2 × 10 mm per applicare la sostanza alla piastra. La piastra di porcellana deve muoversi 10 mm avanti e indietro sotto alla barra di porcellana in un tempo di 0,44 secondi. Ciascuna parte della superficie della piastra e della barra deve essere usata una sola volta; le due estremità di ciascuna barra serviranno per due prove e le due superfici di una piastra serviranno ciascuna per tre prove.

Si esegue una serie di sei prove con un carico di 360 N. Se in queste sei prove si ottiene un evento positivo, si deve eseguire un'ulteriore serie di sei prove con un carico di 120 N. In altri apparecchi, il campione viene confrontato con la sostanza di riferimento scelta usando una procedura di provata validità (ad esempio tecnica «su e giù», ecc.).

1.6.3.4. *Valutazione*

Il risultato della prova viene considerato positivo se si verifica un'esplosione (crepitio e/o una accensione violenta o una fiammata sono equivalenti ad un'esplosione) almeno una volta in una qualunque delle prove con l'apparecchio di attrito specificato o se soddisfa i criteri equivalenti in una prova di attrito alternativa.

2. **DATI**

In linea di principio, si considera che una sostanza presenti un pericolo di esplosione ai sensi della direttiva se si ottiene un risultato positivo nella prova di sensibilità termica, agli urti o all'attrito.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione di prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— identità, composizione, purezza, umidità e così via della sostanza esaminata,

— la forma fisica del campione e se esso sia o no stato macinato, triturato e/o setacciato,

— osservazioni effettuate durante le prove di sensibilità termica (ad esempio massa del campione, numero di frammenti),

— osservazioni eseguite durante le prove di sensibilità meccanica (ad esempio la formazione di quantità considerevoli di fumo o la decomposizione completa senza accensione violenta, fiamme, scintille, crepitii, ecc.),

— risultati di ciascun tipo di prova,

— se è stato usato un apparecchio alternativo, bisogna fornire una giustificazione scientifica e una prova della correlazione tra i risultati ottenuti con l'apparecchio specificato e quelli ottenuti con l'apparecchio equivalente,

▼B

— qualsiasi commento utile, come riferimenti a prove con prodotti simili, che possono essere significativi per una corretta interpretazione dei risultati,

— tutte le osservazioni addizionali significative per l'interpretazione dei risultati.

3.2. INTERPRETAZIONE E VALUTAZIONE DEI RISULTATI

La relazione di prova deve citare gli eventuali risultati considerati falsi, anormali o non rappresentativi. Se qualcuno dei risultati deve essere scartato, deve essere fornita una spiegazione e i risultati di prove alternative o complementari. I risultati anormali, salvo che essi possano venire spiegati, devono essere accettati con i valori sperimentali e usati per classificare conformemente la sostanza.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.

(2) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990.

(3) Koenen, H., Ide, K.H. and Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol. 3, 6-13 and 30-42.

(4) NF T 20-038 (September 85). Chemical products for industrial use — Determination of explosion risk.

▼B

Appendice

Esempi di specifiche dei materiali per la prova di sensibilità termica (vedi DIN 1623)

(1) Tubo: specifica materiali numero 1.0336.505 g

(2) Piastra forata: specifica materiali numero 1.4873

(3) Collare filettato e dado: specifica materiali numero 1.3817

Figura 1

Apparecchio per la prova della sensibilità termica

(quote espresse in millimetri)

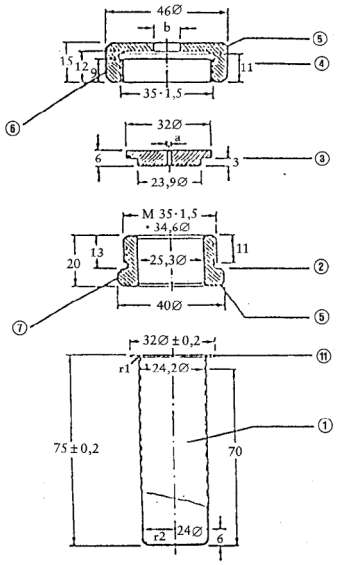


Figura 1a Tubo d'acciaio e accessori

(1) tubo
(1a) flangia esterna
(2) collare filettato: filetto a basso attrito
(3) piastra forata, diametro a = 2,0 o 6,0 mm
(4) dado diametro b = 10 mm
(5) superficie smussata
(6) 2 facce per chiave n. 41

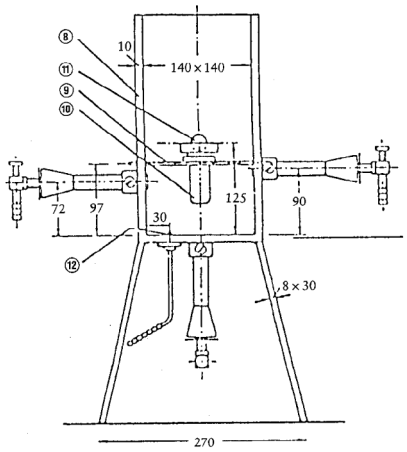


Figura 1b Dispositivo di riscaldamento e protezione

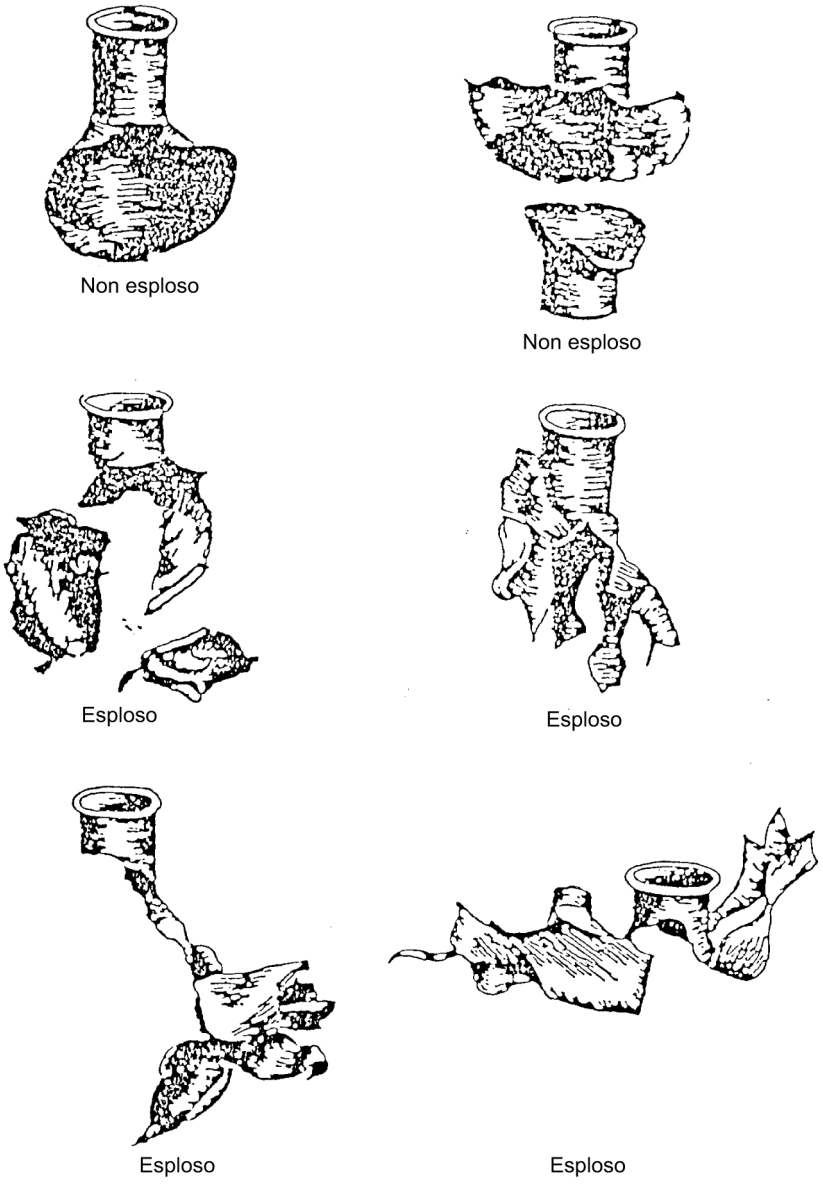
(7) due facce per chiave numero 36
(8) scatola resistente alle schegge
(9) due aste di supporto per il tubo
(10) tubo assemblato
(11) posizione del bruciatore posteriore; gli altri bruciatori sono visibili

▼B

Figura 2

Prova di sensibilità termica

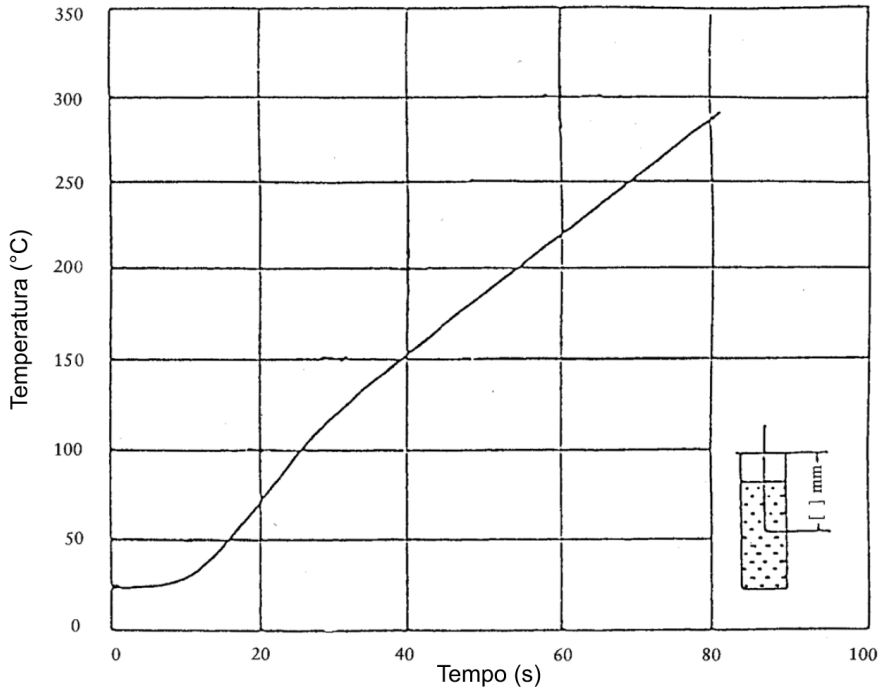
(esempi di frammentazione)



▼B

Figura 3

Taratura della velocità di riscaldamento per la prova di sensibilità termica



Curva temperatura/tempo ottenuta riscaldando dibutilftalato (27 cm^3 in un tubo chiuso (piastra forata da 1,5 mm) con propano ad una portata di 3,2 litri al minuto. La temperatura viene misurata con una termocoppia cromel/alumel con guaina d'acciaio inossidabile del diametro di 1 mm disposta centralmente 43 mm al di sotto del bordo del tubo. La velocità di riscaldamento tra 135 °C e 285 °C deve essere compresa tra 185 e 215 K/min.

▼B

Figura 4

Apparecchio per le prove d'urto

(quote espresse in millimetri)

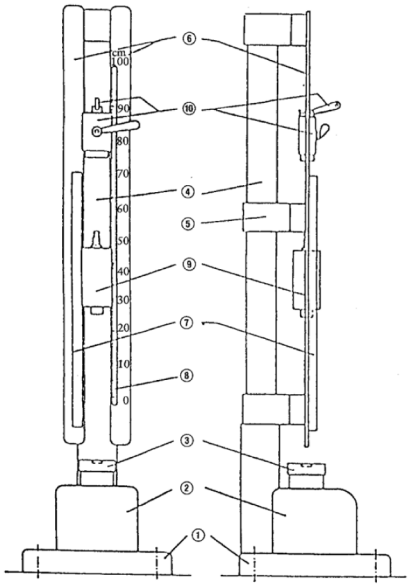


Figura 4a Martello cadente, vista generale frontale e laterale

(1) base, 450 x 450 x 60
(2) blocco d'acciaio, 230 x 250 x 200
(3) incudine, diametro 100 x 70
(4) colonna
(5) traversa mediana
(6) due guide
(7) cremagliera

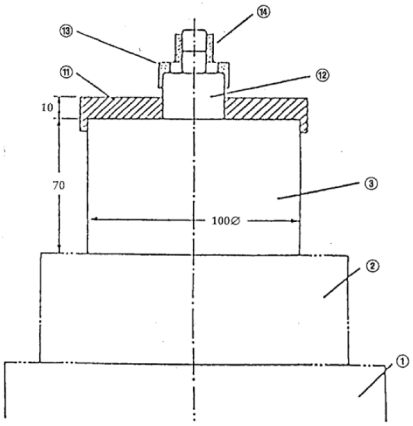


Figura 4b Martello cadente, parte inferiore

(8) scala graduata
(9) martello cadente (massa cadente)
(10) dispositivo di ritenzione e liberazione
(11) piastra di posizionamento
(12) incudine intermedia (sostituibile) diametro 26 x 26
(13) anello di posizionamento con orifici
(14) dispositivo d'urto

▼B

Figura 4

(segue)

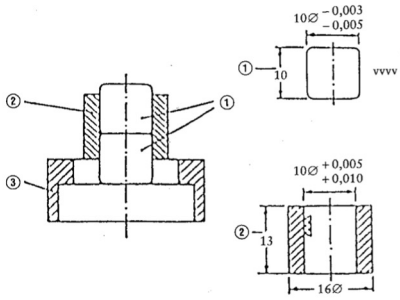


Figura 4c Dispositivo d'urto per sostanze in polvere o in pasta

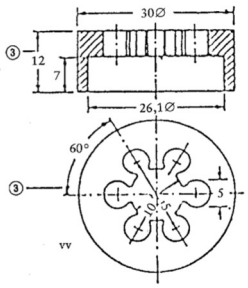
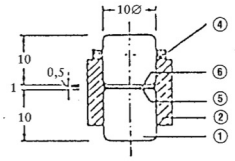


Figura 4d Dispositivo d'urto per sostanze liquide

(1) cilindri d'acciaio
(2) anello di guida per i cilindri d'acciaio
(3) anello di posizionamento con orifici
(a) sezione verticale
(b) pianta
(4) anello di gomma
(5) sostanza liquida (40 mm^3)
(6) spazio libero sopra al liquido



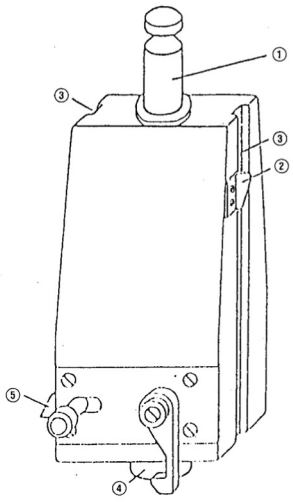


Figura 4e Martello (massa di caduta di 5 kg)

(1) giunto di sospensione
(2) indicatore d'altezza
(3) solco di posizionamento
(4) testa d'urto cilindrica
(5) dente d'arresto

▼B

Figura 5

Apparecchio per la sensibilità all'attrito

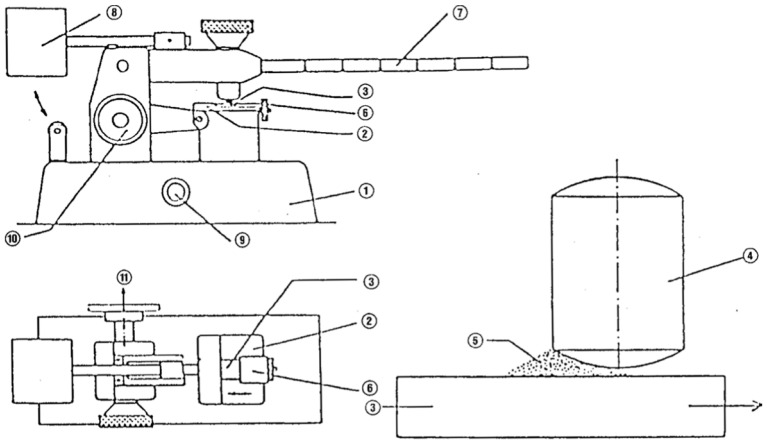


Figura 5a Apparecchio di sfregamento: vista in elevazione e in pianta

(1) base d'acciaio
(2) carrello mobile
(3) piastra di porcellana, 25 x 25 x 5 mm, portata sul carrello
(4) barra di porcellana fissa, diametro 10 x 15 mm
(5) campione in esame, approssimativamente 10 mm^3

Figura 5b Posizione di partenza della barra sul campione

(6) supporto della barra
(7) braccio di armatura
(8) contrappeso
(9) interruttore
(10) ruota per regolare il carrello nella posizione di partenza
(11) direzione verso il motore elettrico

▼B

A.15. **TEMPERATURA DI AUTOACCENSIONE (LIQUIDI E GAS)**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. I metodi di prova internazionali equivalenti o altri metodi di prova applicabili per l'endpoint in questione figurano nella tabella 1 della parte 0.

▼B

A.16. TEMPERATURA DI AUTOACCENSIONE RELATIVA DEI SOLIDI

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. I metodi di prova internazionali equivalenti o altri metodi di prova applicabili per l'endpoint in questione figurano nella tabella 1 della parte 0.

▼B

A.17. PROPRIETÀ OSSIDANTI (SOLIDI)

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. I metodi di prova internazionali equivalenti o altri metodi di prova applicabili per l'endpoint in questione figurano nella tabella 1 della parte 0.

▼B

A.18. **PESO MOLECOLARE MEDIO NUMERICO E DISTRIBUZIONE DEL PESO MOLECOLARE DI POLIMERI**

1. **METODO**

Il presente metodo cromatografico a permeazione di gel corrisponde al metodo OCSE TG 118 (1996). I principi fondamentali e ulteriori informazioni tecniche sono riportati nel riferimento bibliografico (1).

1.1. INTRODUZIONE

Data la varietà delle proprietà dei polimeri, è impossibile descrivere un singolo metodo che definisca con precisione condizioni di separazione e di valutazione tali da coprire tutte le particolarità e specificità che si incontrano nella separazione di polimeri. In particolare, sistemi di polimeri complessi spesso non sono adatti alla cromatografia a permeazione di gel (GPC). Quando non si può ricorrere alla GPC, il peso molecolare può venire determinato mediante altri metodi (vedi allegato). In tali casi, fornire ampi dettagli e la motivazione del metodo usato.

Il metodo descritto è basato sulla norma DIN 55672 (1), nella quale si trovano informazioni dettagliate su come eseguire gli esperimenti e valutare i dati. Nel caso siano necessarie modifiche delle condizioni sperimentali, queste modifiche devono essere motivate. Si possono usare altre norme purché fornite con riferimenti completi. Il metodo descritto ricorre a campioni di polistirene di polidispersità nota per la taratura e può richiedere modifiche per adeguarlo a certi polimeri, per esempio polimeri solubili in acqua e ramificati a catena lunga.

1.2. DEFINIZIONE E UNITÀ

Il peso molecolare medio numerico M_n e il peso molecolare medio ponderale M_w vengono determinati con le seguenti equazioni.

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

in cui

H_i è il livello del segnale del rivelatore relativo alla linea di base per il volume di ritenzione V_i,

M_i è il peso molecolare della frazione di polimero in corrispondenza del volume di ritenzione V_i, e

n è il numero di punti.

L'ampiezza della distribuzione del peso molecolare, che è una misura della dispersità del sistema, è data dal rapporto M_w/M_n.

▼B

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Poiché la GPC è un metodo relativo, è necessaria una taratura. A questo scopo vengono di norma utilizzati standard di polistirene a struttura lineare con pesi molecolari medi M_n e M_w noti e distribuzione nota del peso molecolare. La curva di taratura può venire usata nella determinazione del peso molecolare del campione sconosciuto solo se le condizioni scelte per la separazione del campione e degli standard sono identiche.

Una determinata relazione tra il peso molecolare e il volume di eluizione è valida solo nelle specìfiche condizioni del particolare esperimento. Queste condizioni includono soprattutto la temperatura, il solvente (o miscele di solventi), le condizioni cromatografiche e la colonna e il sistema di colonne di separazione.

I pesi molecolari del campione determinati in questo modo sono valori relativi e sono descritti come «pesi molecolari equivalenti in polistirene». Questo significa che, secondo le differenze strutturali e chimiche tra il campione e gli standard, i pesi molecolari possono deviare dai valori assoluti in misura più o meno grande. Se si usano altri standard, per esempio polietilenglicole, polietilenossido, poli-metil-metacrilato, acido poliacrilico, indicarne la ragione.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO DI ANALISI

Utilizzando la GPC, si possono determinare sia la distribuzione del peso molecolare del campione che i pesi molecolari medi (M_n, M_w). La GPC è un particolare tipo di cromatografia liquida in cui il campione viene separato in base ai volumi idrodinamici dei singoli costituenti (2).

La separazione viene effettuata mentre il campione passa attraverso una colonna riempita di un materiale poroso, tipicamente un gel organico. Le molecole piccole possono penetrare nei pori, mentre le molecole grandi ne sono escluse. Il percorso delle molecole grandi è pertanto più breve e queste vengono eluite per prime. Le molecole di medie dimensioni penetrano in alcuni dei pori e vengono eluite più tardi. Le molecole più piccole, con un raggio idrodinamico più piccolo dei pori del gel, possono penetrare in tutti i pori. Queste vengono eluite per ultime.

In una situazione ideale, la separazione è determinata unicamente dalla dimensione delle specie molecolari, ma in pratica è difficile evitare l'interferenza di almeno qualche effetto di assorbimento. Un riempimento disuniforme della colonna e volumi morti possono peggiorare la situazione (2).

La rivelazione viene effettuata per esempio mediante l'indice di diffrazione o l'assorbimento nell'UV e fornisce una curva di distribuzione semplice. Tuttavia, per attribuire valori effettivi di peso molecolare alla curva, è necessario tarare la colonna facendo passare attraverso di essa polimeri di peso molecolare noto, possibilmente anche di struttura approssimativamente simile, per esempio vari standard di polistirene. Tipicamente si ottiene una curva gaussiana, talvolta distorta con una piccola coda verso il lato dei pesi molecolari bassi, in cui l'asse verticale indica la quantità in peso delle specie di vario peso molecolare eluite e l'asse orizzontale indica il logaritmo del peso molecolare.

▼B

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

La ripetibilità (deviazione standard relativa — Relative Standard Deviation: RSD) de! volume di eluizione dovrebbe essere migliore dello 0,3 %. Se un cromatogramma viene valutato in funzione del tempo e non corrisponde al criterio succitato, la ripetibilità di analisi richiesta deve essere garantita mediante correzione attraverso uno standard interno (1). Le polidispersità dipendono dal peso molecolare degli standard. Nel caso degli standard di polistirene valori tipici sono:

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

(M_p è il peso molecolare dello standard in corrispondenza del massimo del picco)

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI ANALISI

1.6.1. **Preparazione delle soluzioni di polistirene standard**

Gli standard di polistirene vengono sciolti mediante accurata miscelazione nell'eluente scelto. Nella preparazione delle soluzioni tener conto delle raccomandazioni del produttore.

La scelta delle concentrazioni degli standard dipende da vari fattori, per esempio il volume di iniezione, la viscosità della soluzione e la sensibilità del rivelatore analitico. Il volume massimo di iniezione deve essere adeguato alla lunghezza della colonna allo scopo di evitare un sovraccarico. Volumi di iniezione tipici per separazioni analitiche con la GPC su una colonna da 30 cm × 7,8 mm sono normalmente compresi tra 40 e 100 µl. Sono possibili volumi più elevati, ma non devono superare i 250 µl. Il rapporto ottimale tra il volume di iniezione e la concentrazione va determinato prima dell'effettiva taratura della colonna.

1.6.2. **Preparazione della soluzione campione**

In linea di principio, per la preparazione delle soluzioni campione valgono gli stessi requisiti. Il campione viene sciolto in un solvente adatto, per esempio, tetraidrofurano (THF), mediante un accurato sbattimento. In nessun caso deve essere sciolto utilizzando un bagno ad ultrasuoni. Se necessario, la soluzione campione viene purificata su un filtro a membrana con dimensione dei pori compresa tra 0,2 e 2 µm.

Nella relazione finale deve essere registrata l'eventuale presenza di particelle indisciolte perché queste possono essere dovute a specie di peso molecolare elevato. Usare un metodo appropriato per determinare la percentuale in peso delle particelle indisciolte. Utilizzare le soluzioni entro 24 ore.

1.6.3. **Apparecchiature**

— serbatoio del solvente,

— degasatore (se del caso),

— pompa,

▼B

— ammortizzatore di pulsazioni (se del caso),

— sistema di iniezione,

— colonne per cromatografia,

— rivelatore,

— flussimetro (se del caso),

— registratore-elaboratore dati,

— recipiente di scarico.

Assicurarsi che il sistema GPC sia inerte rispetto ai solventi utilizzati (p. es. mediante l'uso di capillari d'acciaio se come solvente si usa il THF).

1.6.4. **Sistema di iniezione e di erogazione del solvente**

Caricare nella colonna un volume definito della soluzione campione utilizzando un autocampionatore oppure manualmente in una zona nettamente definita. Nel caso di una operazione manuale, se lo stantuffo della siringa viene tirato o spinto troppo rapidamente la distribuzione dei pesi molecolari osservata può variare. Nei limiti del possibile il sistema di erogazione del solvente deve essere esente da pulsazioni e l'ideale sarebbe che vi fosse incorporato un attenuatore delle pulsazioni. La portata è dell'ordine di 1 ml/min.

1.6.5. **Colonna**

Secondo il campione, il polimero viene caratterizzato utilizzando una colonna semplice o più colonne collegate in serie. In commercio sono disponibili vari materiali porosi per colonne con proprietà (p. es. dimensione dei pori, limiti di esclusione) definite. La scelta del gel di separazione o della lunghezza della colonna dipende sia dalle proprietà del campione (volumi idrodinamici, distribuzione dei pesi molecolari) che dalle specifiche condizioni di separazione come il solvente, la temperatura e la portata (1) (2) (3).

1.6.6. **Piatti teorici**

La colonna o la combinazione di colonne utilizzata per la separazione deve essere caratterizzata mediante il numero di piatti teorici. Questo, nel caso venga utilizzato il THF come solvente di eluizione, implica di caricare una soluzione di etilbenzene o altro adatto soluto apolare su una colonna di lunghezza nota. Il numero di piatti teorici è dato dall'equazione seguente:

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

in cui

N è = il numero di piatti teorici

V_c è = il volume di eluizione al massimo del picco

▼B

W è = la larghezza del picco alla linea di base

$W_{1/2}$ è = la larghezza del picco a mezza altezza.

1.6.7. **Efficienza di separazione**

Oltre al numero di piatti teorici, che è una quantità che determina l'ampiezza della banda, è importante anche l'efficienza di separazione, che è determinata dalla rapidità della curva di taratura. L'efficienza di separazione di una colonna si ottiene dalla seguente relazione:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{} \geq 6{,}0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

in cui

$V_{e.Mx}$ è = il volume di eluizione per polistirene di peso molecolare M_x

$V_{e(10M_x)}$ = è il volume di eluizione per polistirene di peso molecolare dieci volte maggiore.

La risoluzione del sistema è definita in generale come segue:

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

in cui,

V_{e1}, V_{e2} = sono i volumi di eluizione dei due standard di polistirene al massimo del picco

W_1, W_2 = sono le larghezze del picco alla linea di base

M_1, M_2, = sono i pesi molecolari al massimo del picco (dovrebbero differire di un fattore 10)

Il valore di R del sistema di colonne deve essere maggiore di 1,7 (4).

1.6.8. **Solventi**

Tutti i solventi devono essere di purezza elevata (per il THF si utilizza una purezza del 99,5 %). Il serbatoio del solvente (se necessario sotto atmosfera di gas inerte) deve essere sufficientemente grande per la taratura della colonna e per l'analisi di parecchi campioni. Degasare il solvente prima di trasportarlo alla colonna mediante la pompa.

1.6.9. **Controllo della temperatura**

La temperatura dei componenti interni critici (ansa di iniezione, colonne, rivelatore e tubature) deve essere costante e coerente con il solvente scelto.

▼B

1.6.10. **Rivelatore**

La funzione del rivelatore è di registrare quantitativamente la concentrazione del campione eluito dalla colonna. Per evitare un inutile allargamento dei picchi, il volume della cuvetta della celia del rivelatore deve essere il più piccolo possibile. Salvo per rivelatori a diffrazione della luce e rivelatori di viscosità, questo volume non deve superare i 10 µl. Il metodo di solito utilizzato per la rivelazione è la rifrattometria differenziale. Tuttavia, se richiesto dalle proprietà specifiche del campione o del solvente di eluizione, si possono utilizzare altri tipi di rivelatori, per esempio UV/VIS, IR, rivelatori viscosimetrici, ecc.

2. **DATI E RELAZIONE**

2.1. DATI

Fare riferimento alla norma DIN (1) per i criteri di valutazione dettagliati e per i requisiti di raccolta ed elaborazione dei dati.

Per ciascun campione eseguire due esperimenti indipendenti, che dovranno venire analizzati singolarmente.

Per ogni misura si devono ottenere i valori di M_n, M_w, M_w/M_n e M_p. È necessario indicare esplicitamente che i valori misurati sono valori relativi equivalenti al peso molecolare dello standard usato.

Dopo la determinazione dei volumi di ritenzione o dei tempi di ritenzione (possibilmente corretti usando uno standard interno), i valori di log M_p (M_p sono i massimi dei picchi dello standard di taratura) vengono riportati contro una delle suddette quantità. Per ogni decade di peso molecolare sono necessari almeno due punti di taratura e per la curva totale sono richiesti almeno cinque punti di misura, che devono coprire il peso molecolare stimato del campione. L'estremità della curva di taratura corrispondente al basso peso molecolare è definita da n-esilbenzene o altro soluto apolare adatto. I pesi molecolari medi numerico e ponderale vengono in generale determinati mediante sistemi elettronici di elaborazione dati sulla base delle formule riportate nella sezione 1.2. Se si utilizza una digitalizzazione manuale, si può consultare il metodo ASTM D 3536-91 (3).

La curva di distribuzione deve essere fornita come tabella o come figura (frequenza differenziale o sommatoria delle percentuali contro log M). Nella rappresentazione grafica, una decade di peso molecolare deve avere normalmente una larghezza di circa 4 cm e il massimo del picco deve avere un'altezza di circa 8 cm. Nel caso di curve di distribuzione integrali la differenza in ordinata tra lo 0 e il 100 % deve essere di circa 10 cm.

2.2. RELAZIONE D'ANALISI

La relazione d'analisi deve includere le seguenti informazioni:

2.2.1. **Sostanza in esame:**

— informazioni disponibili sulla sostanza in esame (identità, additivi, impurezze),

▼B

— descrizione del trattamento del campione, osservazioni, problemi.

2.2.2. **Strumentazione:**

— serbatoio dell'eluente, gas inerte, degasaggio dell'eluente, composizione dell'eluente, impurezze,

— pompa, attenuatore di pulsazioni, sistema di iniezione,

— colonne di separazione (fabbricante, tutte le informazioni sulle caratteristiche delle colonne, come dimensione dei pori, tipo di materiale di separazione ecc, numero, lunghezza e ordine delle colonne usate),

— numero di piatti teorici della colonna (o combinazione di colonne), efficienza di separazione (risoluzione del sistema),

— informazioni sulla simmetria dei picchi,

— temperatura della colonna, tipo di controllo della temperatura,

— rivelatore (principio di misurazione, tipo, volume della cuvetta),

— flussimetro se usato (produttore, principio di misurazione),

— sistema di registrazione ed elaborazione dati (hardware e software).

2.2.3. **Taratura del sistema:**

— descrizione dettagliata del metodo usato per costruire la curva di taratura,

— informazioni sui criteri di qualità per questo metodo (p. es. coefficiente di correlazione, varianza ecc),

— informazioni su tutte le estrapolazioni, ipotesi e approssimazioni fatte durante la procedura sperimentale e durante la valutazione e l'elaborazione dei dati,

— tutte le misure usate per costruire la curva di taratura devono essere documentate in una tabella includente le seguenti informazioni per ciascun punto di taratura:

  — nome del campione,

  — produttore del campione,

  — valori caratteristici degli standard M_p , M_n , M_w , M_w/M_n , forniti dal produttore o ricavati da misure successive, insieme con dettagli relativi al metodo di determinazione,

  — volume di iniezione e concentrazione di iniezione,

▼B

— valore di M_p usato per la taratura,

— volume di eluizione o tempo di ritenzione corretto misurato in corrispondenza del massimo dei picchi,

— M_p calcolato al massimo del picco,

— errore percentuale dell' M_p calcolato e del valore di taratura.

2.2.4. **Valutazione:**

— valutazione su base temporale: metodi usati per garantire la riproducibilità richiesta (metodo di correzione, standard interno ecc),

— indicazione se la valutazione sia stata effettuata sulla base del volume di eluizione o del tempo di ritenzione,

— informazioni riguardo ai limiti della valutazione se un picco non viene analizzato completamente,

— descrizione dei metodi di lisciatura, se usati,

— procedure di preparazione e pretrattamento del campione,

— presenza di eventuali particelle indisciolte,

— volume dì iniezione (µl) e concentrazione di iniezione (mg/ml),

— osservazioni indicanti effetti che portano a deviazioni dal profilo GPC ideale,

— descrizione dettagliata di tutte le modifiche applicate alle procedure di analisi,

— dettagli sugli intervalli di errore,

— qualsiasi altra informazione e osservazione utile all'interpretazione dei risultati.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elution-smittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly. D.,D,. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

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

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

▼B

Allegato

Esempi di altri metodi per la determinazione del peso molecolare medio numerico (MN) di polimeri

La cromatografia a permeazione di gel (GPC) è il metodo preferito per la determinazione di M_n, in particolare quando sia disponibile una serie di standard la cui struttura è confrontabile con quella del polimero. Tuttavia, nel caso vi siano difficoltà pratiche per usare la GPC o si preveda già che la sostanza non rispetti un criterio normativo di M_n (che richiede conferma), sono disponibili metodi alternativi come:

1. **Uso di proprietà colligative**

1.1. Ebullioscopia/crioscopia:

prevede la misura dell'innalzamento del punto di ebollizione (ebullioscopia) o dell'abbassamento del punto di congelamento (crioscopia) dì un solvente quando si aggiunge un polimero. Il metodo è basato sul fatto che l'effetto del polimero disciolto sul punto di ebollizione/congelamento del liquido dipende dal peso molecolare del polimero (1) (2).

Applicabilità: $M_n < 20\,000$.

1.2. Abbassamento della tensione di vapore:

prevede la misura della tensione di vapore di un dato liquido di riferimento prima e dopo l'aggiunta di quantità note di polimero (1) (2).

Applicabilità: $M_n < 20\,000$ (in teoria; in pratica però di valore limitato).

1.3. Qsometria su membrana:

è basata sul principio dell'osmosi, cioè della tendenza naturale delle molecole di solvente a passare attraverso una membrana semipermeabile da una soluzione diluita verso una soluzione concentrata fino a raggiungere l'equilibrio. Nel saggio, la soluzione diluita è a concentrazione zero, mentre la soluzione concentrata contiene il polimero. L'effetto di aspirazione del solvente attraverso la membrana dà luogo ad un differenziale di pressione che dipende dalla concentrazione e dal peso molecolare del polimero (1) (3) (4).

Applicabilità: M_n compreso tra 20 000 — 200 000.

1.4. Osmometria in fase vapore:

prevede il confronto della velocità di evaporazione di un aerosol del solvente puro con almeno tre aerosol contenenti il polimero a varie concentrazioni (1) (2) (4).

Applicabilità: $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Analisi dei gruppi terminali**

Per usare questo metodo è necessario conoscere sia la struttura complessiva del polimero che la natura dei gruppi terminali delle catene (che devono poter essere distinti dallo scheletro principale per esempio mediante NMR o titolazione/derivatizzazione). La determinazione della concentrazione molecolare dei gruppi terminali presenti sul polimero può portare ad un valore del peso molecolare (7) (8) (9).

Applicabilità: M_n fino a 50 000 (con affidabilità decrescente).

3. **Bibliografia**

(1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn, John Wiley, New York.

(2) Glover, CA, (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

(3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) Coll, H. (1989), Membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pag. 25-52.

(5) ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(6) Morris, C.E.M., (1989), Vapour Pressure Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

(7) Schröder, E. Muller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Cari Hanser Verlag, Munich.

(8) Garmon, R.G. (1975). End-Group Determinations, Chapter 3. In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed, Marcel Dekker, New York.

(9) Amiya, S, et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

▼B

A.19. CONTENUTO DI FRAZIONI A BASSO PESO MOLECOLARE IN POLIMERI

1. METODO

Questo metodo cromatografico a permeazione di gel corrisponde al metodo OCSE TG 119 (1996). I principi fondamentali e ulteriori informazioni tecniche sono presentati nei riferimenti bibliografici.

1.1. INTRODUZIONE

Data la varietà delle proprietà dei polimeri, è impossibile descrivere un singolo metodo che definisca con precisione condizioni di separazione e di valutazione tali da coprire tutte le particolarità e specificità che si incontrano nella separazione di polimeri. In particolare, sistemi di polimeri complessi spesso non sono adatti alla cromatografia a permeazione di gel (GPC). Quando non si può ricorrere alla GPC, il peso molecolare può venire determinato mediante altri metodi (vedi allegato). In tali casi, fornire ampi dettagli e la motivazione del metodo usato.

Il metodo descritto è basato sulla norma DIN 55672 (1), che contiene informazioni dettagliate su come eseguire gli esperimenti e valutare i dati. Nel caso siano necessarie modifiche delle condizioni sperimentali, queste modifiche devono essere motivate. Si possono usare altre norme purché fornite con riferimenti completi. Il metodo descritto ricorre a campioni di polistirene di polidispersità nota per la taratura e può richiedere modifiche per adeguarlo a certi polimeri, per esempio polimeri solubili in acqua e ramificati a catena lunga.

1.2. DEFINIZIONI E UNITÀ

Un basso peso molecolare è definito arbitrariamente come un peso molecolare inferiore a 1 000 dalton.

Il peso molecolare medio numerico M_n e il peso molecolare medio ponderale M_w vengono determinati con le seguenti equazioni:

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

in cui

H_i = è il livello del segnale del rivelatore relativo alla linea di base per il volume di ritenzione V_i

M_i = è il peso molecolare della frazione di polimero in corrispondenza del volume di ritenzione V_i e n è il numero di punti.

L' ampiezza della distribuzione del peso molecolare, che è una misura della dispersità del sistema, è data dal rapporto M_w/M_n.

▼B

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Poiché la GPC è un metodo relativo, è necessaria una taratura. A questo scopo vengono di norma utilizzati standard di polistirene a struttura lineare con pesi molecolari medi M_n e M_w noti e distribuzione nota del peso molecolare. La curva di taratura può venire usata nella determinazione del peso molecolare del campione sconosciuto solo se le condizioni scelte per la separazione del campione e degli standard sono identiche.

Una determinata relazione tra il peso molecolare e il volume di eluizione è valida solo nelle specifiche condizioni del particolare esperimento. Queste condizioni includono soprattutto la temperatura, il solvente (o miscele di solventi), le condizioni cromatografiche e la colonna e il sistema di colonne di separazione.

I pesi molecolari del campione determinati in questo modo sono valori relativi e sono descritti come «pesi molecolari equivalenti in polistirene». Questo significa che, secondo le differenze strutturali e chimiche tra il campione e gli standard, i pesi molecolari possono deviare dai valori assoluti in misura più o meno grande. Se si usano altri standard, per esempio polietilenglicole, polietilenossido, poli-metil-metacrilato, acido poliacrilico, indicarne la ragione.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO DI ANALISI

Utilizzando la GPC, si possono determinare sia la distribuzione del peso molecolare del campione che i pesi molecolari medi (M_n, M_w). La GPC è un particolare tipo di cromatografia liquida in cui il campione viene separato in base ai volumi idrodinamici dei singoli costituenti (2).

La separazione viene effettuata mentre il campione passa attraverso una colonna riempita di un materiale poroso, tipicamente un gel organico. Le molecole piccole possono penetrare nei pori, mentre le molecole grandi ne sono escluse. Il percorso delle molecole grandi è pertanto più breve e queste vengono eluite per prime. Le molecole di medie dimensioni penetrano in alcuni dei pori e vengono eluite più tardi. Le molecole più piccole, con un raggio ìdrodinamico più piccolo dei pori del gel, possono penetrare in tutti i pori. Queste vengono eluite per ultime.

In una situazione ideale, la separazione è determinata unicamente dalla dimensione delle specie molecolari, ma in pratica è difficile evitare l'interferenza di almeno qualche effetto di assorbimento. Un riempimento disuniforme della colonna e volumi morti possono peggiorare la situazione (2).

La rivelazione viene effettuata per esempio mediante l'indice di diffrazione o l'assorbimento nell'UV e fornisce una curva di distribuzione semplice. Tuttavia, per attribuire valori effettivi di peso molecolare alla curva, è necessario tarare la colonna facendo passare attraverso di essa polimeri di peso molecolare noto, possibilmente anche di struttura approssimativamente simile, per esempio vari standard di polistirene. Tipicamente si ottiene una curva gaussiana, talvolta distorta con una piccola coda verso il lato dei pesi molecolari bassi, in cui l'asse verticale indica la quantità in peso delle specie di vario peso molecolare eluite, e l'asse orizzontale ìndica il logaritmo del peso molecolare.

▼B

Il contenuto di sostanze a basso peso molecolare si ricava da questa curva. Il calcolo può essere accurato solo se le specie di basso peso molecolare hanno una risposta, riferita alla massa, equivalente al polimero nel suo complesso.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

La ripetibilità (deviazione standard relativa — Relative Standard Deviation: RSD) del volume di eluizione dovrebbe essere migliore dello 0,3 %. Se un cromatogramma viene valutato in funzione del tempo e non corrisponde al criterio succitato, la ripetibilità di analisi richiesta deve essere garantita mediante correzione attraverso uno standard interno (1). Le polidispersità dipendono dal peso molecolare degli standard. Nel caso degli standard di polistirene valori tipici sono:

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

(M_p is the molecular weight of the standard at the peak maximum)

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI ANALISI

1.6.1. **Preparazione delle soluzioni di polistirene standard**

Gli standard di polistirene vengono sciolti mediante accurata miscelazione nell'eluente scelto. Nella preparazione delle soluzioni tener conto delle raccomandazioni del produttore.

La scelta delle concentrazioni degli standard dipende da vari fattori, per esempio il volume di iniezione, la viscosità della soluzione e la sensibilità del rivelatore analitico. Il volume massimo di iniezione deve essere adeguato alla lunghezza della colonna allo scopo di evitare un sovraccarico. Volumi di iniezione tipici per separazioni analitiche con la GPC su una colonna da 30 cm × 7,8 mm sono normalmente compresi tra 40 e 100 µl. Sono possibili volumi più elevati, ma non devono superare i 250 µl. Il rapporto ottimale tra il volume di iniezione e la concentrazione deve essere determinato prima dell'effettiva taratura della colonna.

1.6.2. **Preparazione della soluzione campione**

In linea di principio, per la preparazione delle soluzioni campione valgono gli stessi requisiti. Il campione viene sciolto accuratamente in un solvente adatto, per esempio tetraidrofurano (THF), per sbattimento. In nessun caso deve essere sciolto utilizzando un bagno ad ultrasuoni. Se necessario, la soluzione campione viene purificata su un filtro a membrana con dimensione dei pori compresa tra 0,2 e 2 µm.

Nella relazione finale deve essere registrata l'eventuale presenza di particelle indisciolte perché queste possono essere dovute a specie di peso molecolare elevato. Usare un metodo appropriato per determinare la percentuale in peso delle particelle indisciolte. Utilizzare le soluzioni entro 24 ore.

▼B

1.6.3. **Correzione dell'errore dovuto a impurezze e additivi**

É di solito necessaria una correzione del contenuto di specie M < 1 000 che tenga conto del contributo di componenti specifici non polimerici presenti (p. es. impurezze e/o additivi), salvo che il contenuto misurato sia già < 1 %. Questo si ottiene mediante l'analisi diretta della soluzione di polimero o dell'eluato della GPC.

Se, dopo il passaggio attraverso la colonna, l'eluato è troppo diluito per un'ulteriore analisi, occorre concentrarlo. Può essere necessario evaporare l'eluato a secchezza e scioglierlo di nuovo. La concentrazione dell'eluato deve essere condotta in condizioni tali da garantire che non si abbiano cambiamenti nell'eluato. Il trattamento dell'eluato dopo lo stadio di GPC dipende dal metodo analitico usato per la determinazione quantitativa.

1.6.4. **Apparecchiature**

L'apparecchiatura GPC comprende i seguenti componenti:

— serbatoio del solvente,

— degasatore (se del caso),

— pompa,

— ammortizzatore di pulsazioni (se del caso),

— sistema di iniezione,

— colonne per cromatografia,

— rivelatore,

— flussimetro (se del caso),

— registratore-elaboratore dati,

— recipiente di scarico.

Assicurarsi che il sistema GPC sia inerte rispetto ai solventi utilizzati (p. es. mediante l'uso di capillari d'acciaio se come solvente si usa il THF).

1.6.5. **Sistema di iniezione e di erogazione del solvente**

Caricare nella colonna un volume definito della soluzione campione utilizzando un autocampionatore oppure manualmente in una zona nettamente definita. Nel caso di una operazione manuale; se lo stantuffo della siringa viene tirato o spinto troppo rapidamente, la distribuzione dei pesi molecolari osservata può variare. Nei limiti del possibile il sistema di erogazione del solvente deve essere esente da pulsazioni e l'ideale sarebbe che vi fosse incorporato un attenuatore delle pulsazioni. La portata è dell ordine di 1 ml/min.

1.6.6. **Colonna**

Secondo il campione, il polimero viene caratterizzato utilizzando una colonna semplice o più colonne collegate in serie. In commercio sono disponibili vari materiali porosi per colonne con proprietà (p. es. dimensione dei pori, limiti di esclusione) definite. La scelta del gel di separazione o della lunghezza della colonna dipende sia dalle proprietà del campione (volumi idrodinamici, distribuzione dei pesi molecolari) che dalle specifiche condizioni di separazione come il solvente, la temperatura e la portata (1) (2) (3).

▼B

1.6.7. **Piatti teorici**

La colonna o la combinazione di colonne utilizzata per la separazione deve essere caratterizzata dal numero di piatti teorici. Questo, nel caso venga utilizzato il THF come solvente di eluizione, implica di caricare una soluzione di etilbenzene o altro adatto soluto apolare su una colonna di lunghezza nota. Il numero di piatti teorici è dato dall'equazione seguente:

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

in cui,

N è = il numero di piatti teorici

V_e è = il volume di eluizione al massimo del picco

W è = la larghezza del picco alla linea di base

$W_{1/2}$ è = la larghezza del picco a mezza altezza

1.6.8. **Efficienza di separazione**

Oltre al numero di piatti teorici, che è una quantità che determina l'ampiezza della banda, è importante anche l'efficienza di separazione, che è determinata dalla ripidità della curva di taratura. L'efficienza di separazione di una colonna si ottiene dalla seguente relazione:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{cross sectional area of the column}} \geq 6{,}0\left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

in cui

V_{eMx} è = il volume di eluizione per polistirene di peso molecolare M_x

$V_{e,(10Mu)}$ è = il volume di eluizione per polistirene di peso molecolare dieci volte maggiore.

La risoluzione del sistema è definita in generale come segue:

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

in cui,

V_{e1}, V_{e2} = sono i volumi di eluizione dei due standard di polistirene al massimo del picco

W_1, W_2 = sono le larghezze del picco alla linea di base

M_1, M_2 = sono i pesci molecolari al massimo del picco (dovrebbero differire di un fattore 10).

Il valore di R per il sistema di colonne deve essere maggiore di 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Solventi**

Tutti i solventi devono essere di purezza elevata (per il THF si usa una purezza del 99,5 %). Il serbatoio del solvente (se necessario sotto atmosfera di gas inerte) deve essere sufficientemente grande per la taratura della colonna e per l'analisi di parecchi campioni. Degasare il solvente prima di trasportarlo alla colonna mediante la pompa.

1.6.10. **Controllo della temperatura**

La temperatura dei componenti interni critici (ansa di iniezione, colonne, rivelatore e tubature) deve essere costante e coerente con il solvente scelto.

1.6.11. **Rivelatore**

La funzione del rivelatore è di registrare quantitativamente la concentrazione del campione eluito dalla colonna. Per evitare un inutile allargamento dei picchi, il volume della cuvetta della cella del rivelatore deve essere il più piccolo possibile. Salvo per rivelatori a diffrazione della luce e rivelatori a viscosità, questo volume non deve superare i 10 µl. Il metodo di solito utilizzato per la rivelazione è la rifrattometria differenziale. Tuttavia, se richiesto dalle proprietà specifiche del campione o del solvente di eluizione, si possono utilizzare altri tipi di rivelatori, per esempio UV/VIS, IR, rivelatori viscosimetrici ecc.

2. **DATI E RELAZIONE**

2.1. DATI

Fare riferimento alla norma DIN (1) per i criteri di valutazione dettagliati e per i requisiti di raccolta ed elaborazione dei dati.

Per ciascun campione eseguire due esperimenti indipendenti, che dovranno venire analizzati singolarmente. In ogni caso è essenziale determinare i dati anche sui bianchi trattati nelle stesse condizioni del campione.

È necessario indicare esplicitamente che i valori misurati sono valori relativi equivalenti al peso molecolare dello standard usato.

Dopo la determinazione dei volumi di ritenzione o dei tempi di ritenzione (possibilmente corretti usando uno standard interno), i valori di log M_p (M_p sono i massimi dei picchi dello standard di taratura) vengono riportati contro una delle suddette quantità. Per ogni decade di peso molecolare sono necessari almeno due punti di taratura e per la curva totale sono richiesti almeno cinque punti di misura, che devono coprire il peso molecolare stimato del campione. L'estremità della curva di taratura corrispondente al basso peso molecolare è definita da n-esilbenzene o altro soluto apolare adatto. Si determina la porzione della curva corrispondente a pesi molecolari inferiori a 1 000 e, se necessario, la si corregge per compensare impurezze e additivi. In genere le curve di eluzione vengono valutate con sistemi elettronici di elaborazione. Se si utilizza una digitalizzazione manuale, si può consultare il metodo ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Se eventuali polimeri insolubili vengono trattenuti sulla colonna, è probabile che il loro peso molecolare sia più elevato di quello della frazione solubile, e non considerandolo si sovrastimerebbe il contenuto di sostanze di basso peso molecolare. Nell'allegato sono fornite indicazioni per la correzione del contenuto di sostanze a basso peso molecolare per tener conto del polimero insolubile.

La curva di distribuzione deve essere fornita come tabella o come figura (frequenza differenziale o sommatoria delle percentuali contro log M). Nella rappresentazione grafica, una decade di peso molecolare deve avere normalmente una larghezza di circa 4 cm e il massimo del picco deve avere un'altezza di circa 8 cm. Nel caso di curve di distribuzione integrali la differenza in ordinata tra lo 0 e il 100 % deve essere di circa 10 cm.

2.2. RELAZIONE D'ANALISI

La relazione d'analisi deve includere le seguenti informazioni:

2.2.1. **Sostanza in esame**

— informazioni disponibili sulla sostanza in esame (identità, additivi, impurezze),

— descrizione del trattamento del campione, osservazioni, problemi.

2.2.2. **Strumentazione**

— serbatoio dell'eluente, gas inerte, degasaggio dell'eluente, composizione dell'eluente, impurezze,

— pompa, attenuatore di pulsazioni, sistema di iniezione,

— colonne di separazione (fabbricante, tutte le informazioni sulle caratteristiche delle colonne, come dimensione dei pori, tipo di materiale di separazione ecc, numero, lunghezza e ordine delle colonne usate),

— numero di piatti teorici della colonna (o combinazione di colonne), efficienza di separazione (risoluzione del sistema),

— informazioni sulla simmetria dei picchi,

— temperatura della colonna, tipo di controllo della temperatura,

— rivelatore (principio di misurazione, tipo, volume della cuvetta),

— flussimetro se usato (produttore, principio di misurazione),

— sistema di registrazione ed elaborazione dati (hardware e software).

2.2.3. **Taratura del sistema**

— descrizione dettagliata del metodo usato per costruire la curva di taratura,

▼B

— informazioni sui criteri di qualità per questo metodo (coefficiente di correlazione, varianza ecc),

— informazioni su tutte le estrapolazioni, ipotesi e approssimazioni fatte durante la procedura sperimentale e durante la valutazione e l'elaborazione dei dati,

— tutte le misure usate per costruire la curva di taratura devono essere documentate in una tabella includente le seguenti informazioni per ciascun punto di taratura:

— nome del campione,

— produttore del campione,

— valori caratteristici degli standard M_p , M_n , M_w , M_w/M_n, forniti dal produttore o ricavati da misure successive, insieme con dettagli relativi al metodo di determinazione,

— volume di iniezione e concentrazione di iniezione,

— valore di M_p usato per la taratura,

— volume di eluizione o tempo di ritenzione corretto misurato in corrispondenza del massimo dei picchi,

— M_p calcolato al massimo del picco,

— errore percentuale dell'M_p calcolato e del valore di taratura.

2.2.4. **Informazioni sul contenuto di polimero a basso peso molecolare**

— descrizione dei metodi usati nell'analisi e del modo in cui sono stati condotti gli esperimenti,

— informazioni sul contenuto percentuale (p/p) di specie di basso peso molecolare riferito al campione totale;

— informazioni sulle impurezze, gli additivi e altre specie non polimeriche in percentuale in peso riferita al campione totale.

2.2.5. **Valutazione**

— valutazione su base temporale: metodi usati per garantire la riproducibilità richiesta (metodo di correzione, standard interno ecc),

— indicazione se la valutazione sia stata effettuata sulla base del volume di eluizione o del tempo di ritenzione,

— informazioni riguardo ai limiti della valutazione se un picco non viene analizzato completamente,

— descrizione dei metodi di lisciatura, se usati,

— procedure di preparazione e pretrattamento del campione,

— presenza di eventuali particelle indisciolte,

▼B

— volume di iniezione (µl) e concentrazione di iniezione (mg/ml),

— osservazioni indicanti effetti che portano a deviazioni dal profilo GPC ideale,

— descrizione dettagliata di tutte le modifiche applicate alle procedure di analisi,

— dettagli sugli intervalli di errore,

— qualsiasi altra informazione e osservazione utile all'interpretazione dei risultati.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(1) DIN 55672 (1995). Geldpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds. (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J.Wiley and Sons.

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

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

▼B

Allegato

Indicazioni per la correzione del contenuto di specie di basso peso molecolare in funzione della presenza di polimero insolubile

Quando in un campione è presente polimero insolubile, si verifica una perdita di massa durante l'analisi GPC. Il polimero insolubile viene trattenuto in modo irreversibile sulla colonna o sul filtro del campione, mentre la porzione solubile del campione passa attraverso la colonna. Se l'incremento dell'indice di rifrazione (dn/dc) del polimero può essere stimato o misurato, si può stimare la massa di campione persa sulla colonna. In tal caso si effettua una correzione usando una taratura esterna con materiali standard di concentrazione nota e dn/dc noto per tarare la risposta del rifrattometro. Nel seguente esempio si usa uno standard di poli(metilmetacrilato) (pMMA).

Nella taratura esterna per l'analisi di polimeri acrilici, si analizza uno standard di pMMA di concentrazione nota in tetraidrofurano mediante GPC e i dati risultanti vengono usati per trovare la costante del rifrattometro secondo l'equazione:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

in cui:

K = è la costante del rifrattometro (in microvolt secondi/ml),

R = è la risposta dello standard di pMMA (in microvolt/secondi),

C = è la concentrazione dello standard di pMMA (in mg/ml),

V = è il volume di iniezione (in ml) e dn/dc è l'incremento di indice di rifrazione per il pMMA in tetraidrofurano (in ml/mg).

I seguenti sono dati tipici di uno standard di pMMA:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg.

II valore di K risultante, $3{,}05 \times 10^{11}$ viene poi utilizzato per calcolare la risposta teorica del rivelatore se il 100 % del polimero iniettato fosse stato eluito attraverso il rivelatore.

▼B

A.20. **COMPORTAMENTO DI SOLUZIONE/ESTRAZIONE DEI POLIMERI IN ACQUA**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. I metodi di prova internazionali equivalenti o altri metodi di prova applicabili per l'endpoint in questione figurano nella tabella 1 della parte 0.

▼B

A.21. PROPRIETÀ COMBURENTI (LIQUIDI)

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. I metodi di prova internazionali equivalenti o altri metodi di prova applicabili per l'endpoint in questione figurano nella tabella 1 della parte 0.

▼M1

A.22. **DIAMETRO GEOMETRICO MEDIO DELLE FIBRE PONDERATO RISPETTO ALLA LUNGHEZZA**

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Il presente metodo descrive una procedura che permette di misurare il diametro medio geometrico ponderato rispetto alla lunghezza (DMGPL) di fibre minerali artificiali (FMA). Poiché il DMGPL della popolazione ha una probabilità del 95 % di essere compreso nei limiti di confidenza al 95 % (DMGPL ± due errori standard) del campione, il valore riportato (valore di prova) costituirà il limite inferiore di confidenza al 95 % del campione (cioè DMGPL — 2 errori standard). Il presente metodo si basa sull'aggiornamento di una bozza (del giugno 1994) di procedura concordata tra industria e HSE approvata nel corso di una riunione tra la ECFIA e la HSE a Chester il 26 settembre 1993 e sviluppata per e sulla base di un secondo confronto interlaboratoriale (1, 2). Questo metodo di misurazione può essere utilizzato per caratterizzare il diametro delle fibre di sostanze in massa o di prodotti contenenti FMA, comprese fibre ceramiche refrattarie (FCR), fibre vetrose artificiali (FVA) e fibre cristalline e policristalline.

La ponderazione in base alla lunghezza permette di compensare gli effetti sulla distribuzione del diametro dovuti alla rottura delle fibre lunghe durante il campionamento o la manipolazione del materiale. Per misurare la distribuzione dei diametri delle FMA sono utilizzate statistiche geometriche (media geometrica), giacché tali diametri hanno una distribuzione prossima alla distribuzione lognormale.

La misurazione della lunghezza e del diametro è un'operazione noiosa e lunga ma, se sono misurate solo le fibre in contatto con una linea infinitamente sottile del campo di visione del microscopio elettronico a scansione (SEM), la probabilità di selezionare una determinata fibra è proporzionale alla sua lunghezza. Poiché questo metodo tiene conto della lunghezza nei calcoli di ponderazione in base alla lunghezza, l'unica misurazione necessaria è quella del diametro, mentre il DMGPL-2ES può essere calcolato come descritto.

1.2. DEFINIZIONI

Particella: Oggetto il cui rapporto lunghezza/larghezza è inferiore a 3:1.

Fibra: Oggetto il cui rapporto lunghezza/larghezza (rapporto di allungamento) è di almeno 3:1.

1.3. SCOPO E LIMITAZIONI

Questo metodo è inteso ad esaminare la distribuzione dei diametri aventi un valore mediano compreso tra 0,5 e 6 μm. I diametri superiori possono essere misurati utilizzando ingrandimenti inferiori del SEM, ma questo metodo tende ad essere sempre più limitato man mano che la distribuzione dimensionale delle fibre diventa più fine. Per contro, se il diametro mediano è inferiore a 0,5 μm si raccomanda di eseguire le misurazioni con un microscopio elettronico a trasmissione (MET).

▼M1

1.4. PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA

Un certo numero di campioni rappresentativi sono prelevati da un materassino (o feltro) di fibre oppure da fibre sciolte in massa. La lunghezza delle fibre in massa è ridotta per compressione, quindi un subcampione rappresentativo è disperso in acqua. Ne vengono estratte delle aliquote, che sono filtrate tramite un filtro in policarbonato con pori di 0,2 μm, prima di essere preparate per l'esame con la tecnica di microscopia elettronica a scansione (SEM). I diametri delle fibre sono misurati con un ingrandimento dello schermo di 10 000 × o maggiore ([1]) utilizzando il metodo della linea trasversale, in modo da ottenere una stima non distorta del diametro medio. L'intervallo inferiore di confidenza al 95 % (sulla base di un test unilaterale) è calcolato per ottenere una stima del valore minimo del diametro medio geometrico delle fibre del materiale.

1.5. DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

1.5.1. **Sicurezza/precauzioni**

L'esposizione del personale alle fibre in sospensione nell'atmosfera deve essere ridotta al minimo, e devono essere utilizzate una cappa d'aspirazione o un *glove box* in occasione della manipolazione delle fibre allo stato secco. Per determinare l'efficacia dei metodi di controllo dovranno essere eseguiti controlli periodici dell'esposizione del personale. In occasione della manipolazione delle FMA, il personale dovrà indossare guanti monouso per ridurre i rischi d'irritazione cutanea ed evitare qualsiasi contaminazione incrociata.

1.5.2. **Apparecchiatura/attrezzatura**

— Presse e matrici (capaci di produrre 10 MPa).

— Filtri in policarbonato a pori capillari di 0,2 μm (25 mm di diametro).

— Filtro a membrana in esteri misti di cellulosa (EMC) con porosità di 5 μm da utilizzare come filtro di supporto.

— Apparecchio di filtrazione in vetro (o sistemi di filtrazione monouso) disegnati per filtri di 25 mm di diametro (per esempio, kit di micro-analisi in vetro Millipore n. XX10 025 00).

— Acqua distillata di recente e filtrata attraverso un filtro con porosità di 0,2 μm per eliminare i microrganismi.

— Sistema di ricoprimento tramite bombardamento catodico (*sputter coater*) con sorgente in oro o oro/palladio.

— Microscopio elettronico a scansione con una risoluzione che può scendere fino a 10 nm ed un ingrandimento 10 000 ×.

— Varie: spatole, lama di bisturi di tipo 24, piccole pinze, supporti (*stubs*) per SEM, adesivo o nastro adesivo al carbonio, argento colloidale.

— Sonda ultrasonica o bagno a ultrasuoni da laboratorio

— Una sonda di carotaggio, per prelevare campioni nei materassini (o feltri) di FMA

([1]) questo valore d'ingrandimento è indicato per le fibre con diametri intorno a 3 μm. Per le fibre con diametro di 6 μm può essere più adatto un ingrandimento di 5 000 ×.

▼M1

1.5.3. **Procedura**

1.5.3.1. *Campionamento*

Per materassini o feltri, si utilizza una sonda di carotaggio da 25 mm per prelevare campioni dall'intero spessore. I prelievi devono essere effettuati ad intervalli uguali su tutta l'ampiezza di una porzione ridotta di tessuto o in zone scelte in modo casuale, se sono disponibili materiali di maggiore lunghezza. La stessa attrezzatura può essere utilizzata per estrarre campioni casuali dalle fibre sciolte. Ove possibile, dovrebbero essere prelevati sei campioni in modo da riflettere le variazioni spaziali nel materiale in massa.

I sei campioni devono essere compressi in una pressa da 50 mm di diametro ad una pressione di 10 MPa. Il materiale viene successivamente mescolato con una spatola e compresso di nuovo a 10 MPa. Quindi il materiale viene tolto dalla pressa e conservato in una bottiglia in vetro a chiusura ermetica.

1.5.3.2. *Preparazione del campione*

Se necessario, i leganti organici possono essere eliminati mettendo il campione in muffola a 450 °C per circa un'ora.

Utilizzare sistemi di partizione e quartatura per suddividere il campione (l'operazione deve essere realizzata all'interno di una cappa aspirante per polveri).

Con una spatola, aggiungere una piccola quantità (< 0,5 g) di campione a 100 ml di acqua distillata di recente e filtrata per mezzo di un filtro a membrana da 0,2 μm (può essere utilizzata acqua ultrapura di diversa origine, a condizione che sia di qualità soddisfacente). Disperdere accuratamente con una sonda ultrasonica a 100 W, regolata in modo da produrre cavitazione. (Se non si dispone di sonda, si utilizzi il metodo seguente: agitare ed invertire ripetutamente per 30 secondi; sottoporre ad ultrasuoni in un bagno ad ultrasuoni da laboratorio per cinque minuti: quindi agitare e invertire ripetutamente per altri 30 secondi).

Immediatamente dopo la dispersione delle fibre, prelevare un certo numero di aliquote (per esempio, tre aliquote di 3, 6 e 10 ml) per mezzo di una pipetta ad imboccatura larga (capacità di 2-5 ml).

Filtrare sotto vuoto ciascuna aliquota per mezzo di un filtro in policarbonato da 0,2 μm sostenuto da un filtro di supporto in EMC con porosità di 5 μm, utilizzando un imbuto di filtrazione in vetro da 25 mm con un serbatoio cilindrico. Porre circa 5 ml d'acqua distillata filtrata nell'imbuto e inserire lentamente nell'acqua le aliquote con l'aiuto di una pipetta, tenendo la punta della pipetta di sotto del menisco. La pipetta ed il serbatoio devono essere accuratamente puliti dopo l'utilizzo giacché le fibre più fini tendono ad aderire di più sulle superfici.

Rimuovere delicatamente il filtro e separarlo dal filtro di supporto prima di metterlo ad asciugare in un contenitore.

▼M1

Operando con movimento rotatorio, tagliare una sezione pari alla metà o a un quarto del deposito filtrato con una lama di bisturi di tipo 24. Fissare accuratamente la sezione tagliata sullo stub per il SEM mediante dischetto adesivo al carbonio o collante al carbonio. L'argento colloidale deve essere applicato almeno in tre punti per migliorare il contatto elettrico tra i bordi del filtro e lo stub. Quando l'adesivo/l'argento colloidale è asciutto, ricoprire la superficie del deposito per mezzo dello *sputter coater* con uno strato di circa 50 nm d'oro o d'oro/palladio.

1.5.3.3. *Taratura e funzionamento del SEM*

1.5.3.3.1. Taratura

La taratura del SEM deve essere verificata almeno una volta alla settimana (idealmente una volta al giorno) per mezzo di una griglia di taratura certificata. I valori della taratura devono essere confrontati con uno standard certificato e se il valore misurato (SEM) non rientra entro ± 2 % del valore certificato, la taratura con il SEM deve essere aggiustata e ricontrollata.

Il SEM deve essere in grado di fornire una risoluzione tale da rendere visibile almeno un diametro minimo di 0,2 μm, utilizzando un campione in matrice reale con un ingrandimento di 2 000 ×.

1.5.3.3.2. Modalità operative

Il SEM deve essere utilizzato con un ingrandimento di 10 000 ([1]) in condizioni che offrono una buona risoluzione ed un'immagine accettabile a velocità di scansione ridotta (per esempio, 5 secondi per schermo). Benché le condizioni operative possano variare da un SEM all'altro, per ottenere la migliore visibilità e risoluzione possibile con materiali di peso atomico relativamente basso, occorre utilizzare in generale tensioni d'accelerazione di 5-10 keV con una dimensione dello spot ridotta ed una distanza minima. Quando si applica il metodo della linea trasversale, occorre utilizzare un tilt di 0° per ridurre al minimo la necessità di rimessa a fuoco o, se il SEM ha una base eucentrica, utilizzare la distanza di lavoro eucentrica. Un ingrandimento inferiore può essere utilizzato se il materiale non contiene fibre di piccolo diametro ma fibre con diametri più grandi (> 5 μm).

1.5.3.4. *Misurazione*

1.5.3.4.1. Esame a debole ingrandimento per valutare il campione

Inizialmente, il campione deve essere esaminato con un debole ingrandimento per verificare l'esistenza di agglomerati di grandi fibre e per determinare la densità delle fibre.

In caso di eccessiva agglomerazione, si raccomanda di preparare un nuovo campione. Per garantire l'accuratezza delle statistiche, occorre misurare un numero minimo di fibre. È preferibile una densità elevata di fibre, giacché l'esame di campi vuoti richiede tempo e non contribuisce all'analisi. Tuttavia, se il filtro è sovraccarico, può diventare difficile dimensionare tutte le fibre misurabili. Inoltre, le fibre più piccole potrebbero passare inosservate perché nascoste da quelle più grandi.

([1]) Per fibre da 3 μm, cfr. la nota precedente.

▼M1

Una densità delle fibre superiore a 150 fibre per millimetro lineare trasversale può comportare una sopravvalutazione del DMGPL. D'altra parte, basse concentrazioni di fibre aumentano il tempo d'analisi. È inoltre spesso più efficiente in termine di costi preparare un campione di una densità vicina al valore ottimale, piuttosto che contare filtri a bassa concentrazione. La densità di fibre ottimale deve corrispondere ad una media di circa una o due fibre conteggiabili per campo visivo ad un ingrandimento di 5 000 ×. Tuttavia, poiché la densità ottimale dipende dalla dimensione (diametro) delle fibre, l'operatore dovrà decidere in base alla propria esperienza se la densità delle fibre è vicina al valore ottimale.

1.5.3.4.2. Ponderazione in base alla lunghezza dei diametri delle fibre

Solo le fibre che toccano (o attraversano) una linea (infinitamente) sottile tracciata sullo schermo del SEM sono contate. Per questo motivo viene tracciata una linea orizzontale (o verticale) attraverso il centro dello schermo.

In alternativa, si può fissare un unico punto al centro dello schermo e procedere ad una scansione continua in una sola direzione attraverso il filtro. Si misura e registra il diametro di qualsiasi fibra il cui rapporto tra lunghezza e diametro è superiore a 3:1 e che tocca o incrocia tale punto.

1.5.3.4.3. Misurazione delle fibre

Si raccomanda di misurare almeno 300 fibre. Ogni fibra è misurata una sola volta, nel punto d'intersezione con la linea o con il punto tracciato sullo schermo (o vicino al punto d'intersezione se i bordi della fibra sono nascosti). Se sono presenti fibre di sezione variabile, deve essere utilizzata una misura rappresentativa del diametro medio della fibra. Si dovrà prestare la massima cura nella definizione del bordo e nella misurazione della distanza più breve tra i bordi delle fibre. La misura può essere fatta direttamente o su immagini o fotografie registrate. Si raccomanda di utilizzare sistemi di misura d'immagine semiautomatici che trasferiscono direttamente i dati in un foglio di calcolo, giacché tale procedimento permette di guadagnare tempo, di evitare errori di trascrizione e di automatizzare i calcoli.

Le estremità delle fibre lunghe devono essere verificate con un ingrandimento più debole per assicurare che non ritornino nel campo di visione in cui è effettuata la misurazione e che siano misurate una sola volta.

2. **DATI**

2.1. TRATTAMENTO DEI RISULTATI

In generale, i diametri delle fibre non hanno una distribuzione normale. È tuttavia possibile ottenere una distribuzione che si avvicina a quella normale effettuando una trasformazione logaritmica.

Calcolare la media aritmetica (media lnD) e la deviazione standard (DS_{lnD}) dei valori logaritmici in base *e* (lnD) dei diametri (D) delle n fibre.

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

▼M1

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

La deviazione standard è divisa per la radice quadrata del numero di misurazioni effettuate (n) per ottenere l'errore standard (ES_{lnD}).

$$ES_{lnD} = \frac{DS}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Sottrarre due volte l'errore standard dalla media e calcolare l'esponenziale di questo valore (media meno due errori standard) per ottenere la media geometrica meno due errori standard geometrici.

$$DMGOPL - 2ES = e^{(\text{media } lnD - 2ES_{lnd})} \quad (4)$$

3. **RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DELLA PROVA**

RAPPORTO DI PROVA

Il rapporto di prova conterrà almeno le informazioni seguenti:

— Il valore del DMGPL -2ES.

— Tutte le eventuali modifiche procedurali, in particolare quelle che rischiano di influire sulla precisione e l'affidabilità dei risultati, nonché le relative giustificazioni.

4. **BIBLIOGRAFIA**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.

2. G. Burdett e G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼M4

A.23. COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE (1-OTTANOLO/ACQUA): METODO DELL'AGITAZIONE LENTA

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova equivale alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 123 (2006). Il metodo dell'agitazione lenta ha permesso di determinare con esattezza valori logaritmici del coefficiente di ripartizione 1-ottanolo/acqua (P_{OW}) fino a 8,2 (1). Costituisce pertanto un approccio sperimentale adeguato per la determinazione diretta del P_{OW} di sostanze fortemente idrofobiche.

2. Tra gli altri metodi per la determinazione del coefficiente di ripartizione 1-ottanolo/acqua (P_{OW}) si annoverano il metodo «dell'agitazione in bottiglia» (shake flask) (2) e la determinazione del P_{OW} dal comportamento di ritenzione nell'HPCL (cromatografia liquida ad alta prestazione) a fase inversa (3). Il metodo «dell'agitazione in bottiglia» tende a falsare i risultati a causa del trasferimento di microgoccioline di ottanolo nella fase acquosa. Con l'aumento dei valori del P_{OW}, la presenza di queste goccioline nella fase acquosa porta ad una crescente sovrastimazione della concentrazione della sostanza in esame nell'acqua. L'applicazione di questo metodo è pertanto limitata alle sostanze con log $P_{OW} < 4$. Il secondo metodo si basa su valori affidabili di P_{OW} determinati direttamente per calibrare la relazione tra il comportamento di ritenzione nell'HPLC e i valori P_{OW} misurati. Esisteva un progetto di linea guida OCSE per determinare i coefficienti di ripartizione 1-ottanolo/acqua di sostanze ionizzabili (4) che tuttavia è stato abbandonato.

3. Il presente metodo di prova è stato messo a punto nei Paesi Bassi. La precisione dei metodi descritti è stata validata e ottimizzata nel corso di uno studio di validazione interlaboratorio (ring test) al quale hanno partecipato 15 laboratori (5).

CONSIDERAZIONI INIZIALI

Significato e utilizzo

4. Nel caso di sostanze organiche inerti, sono state individuate relazioni molto significative tra i coefficienti di ripartizione 1-ottanolo/acqua (P_{OW}) e il bioaccumulo di queste sostanze nei pesci. Inoltre, è stata anche dimostrata una correlazione tra il P_{OW} e, da un lato, la tossicità per i pesci e, dall'altro, l'assorbimento di sostanze chimiche nei solidi, come suoli e sedimenti Il riferimento bibliografico (6) contiene un'ampia panoramica di queste relazioni.

5. È stata accertata l'esistenza di una vasta gamma di relazioni tra il coefficiente di ripartizione 1-ottanolo/acqua e altre proprietà delle sostanze, di interesse per la chimica e la tossicologia ambientali. Il coefficiente di ripartizione 1-ottanolo/acqua è pertanto diventato un parametro fondamentale ai fini della valutazione del rischio ambientale delle sostanze chimiche e della previsione del destino di tali sostanze nell'ambiente.

Ambito di applicazione

6. Si ritiene che il metodo dell'agitazione lenta riduca la formazione di microgoccioline dalle goccioline di 1-ottanolo nella fase acquosa; di conseguenza non si verifica la sovrastimazione della concentrazione in fase acquosa dovuta all'associazione di molecole della sostanza di prova a queste goccioline. Il metodo dell'agitazione lenta si presta in particolare alla determinazione del P_{OW} di sostanze con log P_{OW} previsto uguale o superiore a 5, per le quali il metodo dell'agitazione in bottiglia (2) tende a fornire risultati erronei.

▼M4

DEFINIZIONI E UNITÀ

7. Il coefficiente di ripartizione di una sostanza tra l'acqua e un solvente lipofilo (1-ottanolo) caratterizza la distribuzione in equilibrio della sostanza chimica tra le due fasi. Il coefficiente di ripartizione 1-ottanolo/acqua (P_{OW}) è definito come il rapporto tra la concentrazione in equilibrio della sostanza in esame in 1-ottanolo saturato con acqua (C_O) e la concentrazione in equilibrio della sostanza in esame in acqua saturata con 1-ottanolo (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

In quanto rapporto tra due concentrazioni si tratta di un valore adimensionale. Generalmente è espresso con il suo logaritmo decimale (log P_{OW}). Visto che il P_{OW} dipende dalla temperatura, la relazione sulla prova dovrà precisare la temperatura delle determinazioni.

PRINCIPIO DEL METODO

8. Al fine di determinare il coefficiente di ripartizione, l'acqua, l'1-ottanolo e la sostanza in esame devono essere portati in equilibrio tra loro a temperatura costante. Si procede successivamente a misurare le concentrazioni della sostanza in esame nelle due fasi.

9. Il metodo dell'agitazione lenta proposto permette di ridurre le difficoltà sperimentali associate alla formazione di microgoccioline che si verificano nel metodo dell'agitazione in bottiglia. Con il metodo dell'agitazione lenta, l'acqua, l'1-ottanolo e la sostanza in esame si equilibrano in un reattore termostatato sottoposto ad agitazione. Gli scambi tra le fasi sono accelerati dall'agitazione. Quest'ultima produce una leggera turbolenza che favorisce gli scambi tra 1-ottanolo e acqua senza provocare la formazione di microgoccioline (1).

APPLICABILITÀ DELLA PROVA

10. Dato che la presenza di sostanze diverse dalla sostanza in esame potrebbe influenzare il coefficiente di attività di quest'ultima, essa deve essere testata allo stato puro. Ai fini della determinazione del coefficiente di ripartizione 1-ottanolo/acqua occorre utilizzare una sostanza che presenti il grado di purezza più elevato disponibile in commercio.

11. Il presente metodo si applica alle sostanze pure che non si dissociano né si associano e che non manifestano un'attività interfacciale significativa. Può essere utilizzato per determinare il coefficiente di ripartizione 1-ottanolo/acqua di tali sostanze e delle relative miscele. In quest'ultimo caso, i coefficienti di ripartizione ottenuti variano in funzione della composizione chimica della miscela in esame e della composizione elettrolitica della fase acquosa. Adottando alcune misure supplementari, il metodo può essere applicato anche a sostanze che si dissociano o si associano (paragrafo 12).

12. A motivo della molteplicità di equilibri dell'acqua e dell'1-ottanolo presenti nella ripartizione 1-ottanolo/acqua delle sostanze dissociabili, come acidi organici e fenoli, basi organiche e composti organometallici, il coefficiente di ripartizione 1-ottanolo/acqua è una costante fortemente dipendente dalla composizione elettrolitica (7) (8). Ai fini della determinazione di questo coefficiente, è necessario controllare il pH e la composizione elettrolitica, i cui valori devono essere riportati nella relazione sulla prova. La valutazione di questi coefficienti di ripartizione deve essere effettuata da specialisti («giudizio esperto»). Utilizzando i valori delle costanti di dissociazione, occorre scegliere valori di pH adeguati in modo da stabilire un coefficiente di ripartizione per ciascuno stato di ionizzazione. I composti organometallici devono essere testati usando tamponi non complessanti (8). Alla luce delle conoscenze attuali in materia di chimica in fase acquosa (costanti di complessazione e di dissociazione), le condizioni sperimentali devono essere scelte in modo da poter stimare la speciazione della sostanza in esame in fase acquosa. La forza ionica deve essere identica in tutti gli esperimenti, grazie all'utilizzo di un elettrolita di fondo.

▼M4

13. Le sostanze con bassa idrosolubilità o un elevato valore P_{OW} possono creare problemi in quanto le loro concentrazioni in acqua sono talmente deboli che diventa difficile determinarle con esattezza. Il presente metodo di prova fornisce indicazioni su come risolvere questo problema.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

14. Il livello di purezza dei reagenti chimici deve corrispondere almeno al grado analitico. Si raccomanda di utilizzare sostanze non marcate, di composizione chimica nota e di purezza pari almeno al 99 % o sostanze radiomarcate di composizione chimica e purezza radiochimica note. Nel caso di traccianti radioattivi a breve emivita, occorre applicare correzioni a fronte della degradazione. Se la sostanza in esame è radiomarcata, occorre usare un metodo analitico specifico, in modo che la radioattività misurata sia correlata direttamente alla sostanza in esame.

15. La stima del valore log v può essere ottenuta utilizzando gli appositi software venduti in commercio, o basandosi sul rapporto tra le solubilità in entrambi i solventi.

16. Prima di applicare il metodo dell'agitazione lenta per la determinazione del P_{OW}, occorre disporre delle seguenti informazioni sulla sostanza in esame:

a) formula strutturale;

b) metodi analitici adeguati per la determinazione della concentrazione della sostanza in acqua e in 1-ottanolo;

c) costante o costanti di dissociazione di sostanze ionizzabili (Linea guida OCSE n. 112) (9);

d) idrosolubilità (10);

e) idrolisi abiotica (11);

f) pronta biodegradabilità (12);

g) tensione di vapore (13).

DESCRIZIONE DEL METODO

Materiale e apparecchiatura

17. L'esperimento richiede un'apparecchiatura standard di laboratorio, in particolare:

— agitatori magnetici e bacchette di agitazione magnetiche rivestite di Teflon per agitare la fase acquosa,

— strumenti analitici che permettono di determinare la concentrazione della sostanza in esame alle concentrazioni previste,

— un agitatore dotato di rubinetto alla base. In funzione della stima del log P_{OW} e del limite di rivelabilità (*Limit of Detection* — LOD) della sostanza in esame, occorre considerare l'utilizzo di un recipiente di reazione con la medesima geometria ma di volume superiore ad un litro, in modo da ottenere un volume di acqua sufficiente per l'estrazione e l'analisi chimiche. La concentrazione della sostanza in esame nell'estratto acquoso sarà pertanto più elevata, rendendo così più affidabile la determinazione analitica. All'appendice 1 figura una tabella che riporta le stime del volume minimo necessario, il LOD del composto, la stima del valore log P_{OW} e l'idrosolubilità del composto. La tabella si basa sulla relazione tra il log P_{OW} e il rapporto tra le solubilità in ottanolo e in acqua, secondo Pinsuwan et al. (14):

$$\log P_{OW} = 0,\ 88 \log SR + 0,\ 41$$

▼M4

dove:

$SR = S_{oct}/S_w$ (concentrazione molare),

e sulla relazione presentata da Lyman (15) per la stima dell'idrosolubilità. Le idrosolubilità calcolate con l'equazione riportata nell'appendice 1 sono da considerarsi come una prima stima. Occorre rilevare che l'utilizzatore è libero di determinare l'idrosolubilità mediante qualsiasi altro rapporto che si ritenga rappresenti meglio il rapporto tra idrofobicità e solubilità. Per i composti solidi, ad esempio, si raccomanda di includere il punto di fusione nella previsione della solubilità. Se si utilizza un'equazione modificata, occorre accertarsi che l'equazione per il calcolo della solubilità in ottanolo sia tuttora valida. L'appendice 2 riporta una rappresentazione schematica di un agitatore con rivestimento esterno in vetro, di capacità di circa un litro. Le proporzioni del contenitore rappresentato nell'appendice 2 si sono dimostrate ottimali e devono essere mantenute qualora si utilizzi un apparecchiatura di dimensioni diverse,

— è indispensabile disporre di un dispositivo per mantenere costante la temperatura durante l'esperimento di agitazione lenta.

18. I recipienti devono essere in materiale inerte in modo che l'adsorbimento sulle loro superfici sia trascurabile.

Preparazione delle soluzioni di prova

19. La determinazione del P_{OW} deve essere eseguita utilizzando 1-ottanolo della qualità più pura disponibile in commercio (grado di purezza minima di 99 %). Si raccomanda di purificare la soluzione mediante estrazione acida, basica e con acqua, seguita da essiccazione. L'1-ottanolo può, inoltre, essere purificato per distillazione. Le soluzioni standard delle sostanze in esame devono essere preparate con 1-ottanolo purificato. L'acqua usata per la determinazione del P_{OW} deve essere distillata in apparecchi di vetro o quarzo, o trattata con un sistema di purificazione o di qualità HPLC. La filtrazione dell'acqua distillata deve essere eseguita mediante filtro di 0,22 μm; è altresì necessario prevedere delle prove in bianco per assicurarsi che gli estratti concentrati non contengano impurità che possano interferire con la sostanza in esame. Se si usa un filtro in fibra di vetro, occorre pulirlo lasciandolo almeno tre ore in un forno a 400 °C.

20. Entrambi i solventi devono essere reciprocamente saturati prima dell'esperimento, portandoli all'equilibrio in un recipiente sufficientemente grande. A tal fine occorre sottoporre il sistema a due fasi di agitazione lenta per due giorni.

21. Selezionare un'adeguata concentrazione della sostanza in esame e scioglierla in 1-ottanolo (saturato con acqua). È necessario determinare il coefficiente di ripartizione in soluzioni diluite in 1-ottanolo e acqua. Pertanto la concentrazione della sostanza di prova non deve superare il 70 % della sua solubilità con una concentrazione massima di 0,1 M in ciascuna fase (1). Le soluzioni di 1-ottanolo utilizzate per l'esperimento devono essere prive della sostanza in esame in sospensione allo stato solido.

22. Sciogliere la quantità adeguata di sostanza in esame in 1-ottanolo (saturato con acqua). Se la stima del valore logaritmico di P_{OW} è superiore a 5, ci si deve assicurare che le soluzioni di 1-ottanolo utilizzate per l'esperimento non contengano la sostanza in esame in sospensione allo stato solido. A tale fine, si esegue la procedura seguente per le sostanze chimiche il cui valore stimato di log P_{OW} è > 5:

— si scioglie la sostanza in esame in 1-ottanolo (saturato con acqua),

▼M4

— si lascia riposare la soluzione sufficientemente a lungo perché la sostanza solida sospesa si depositi. Durante la decantazione, la concentrazione della sostanza in esame è monitorata,

— una volta che le concentrazioni misurate nella soluzione di 1-ottanolo hanno raggiunto un valore stabile, si diluisce la soluzione madre con un volume adeguato di 1-ottanolo,

— si misura la concentrazione della soluzione madre diluita. Se la concentrazione misurata è coerente con la diluizione, la soluzione madre diluita può essere utilizzata nell'esperimento ad agitazione lenta.

Estrazione e analisi di campioni

23. L'analisi della sostanza in esame è effettuata mediante un metodo analitico convalidato. I ricercatori devono dimostrare che, durante la prova, le concentrazioni nella fase di 1-ottanolo saturato con l'acqua e in fase acquosa saturata con 1-ottanolo sono superiori al limite di quantificazione del metodo analitico usato. Occorre stabilire prima dell'esperimento i recuperi analitici mediante analisi della sostanza in esame in fase acquosa e in fase 1-ottanolo, laddove siano necessari metodi di estrazione. Il segnale analitico deve essere corretto per tenere conto delle prove in bianco e si provvederà ad evitare qualsiasi trasferimento dell'analita da un campione all'altro.

24. Prima dell'analisi, in caso di basse concentrazioni delle sostanze di prova idrofobiche in fase acquosa, sarà probabilmente necessario estrarre la fase acquosa mediante un solvente organico e preconcentrare l'estratto. Per la stessa ragione, è necessario ridurre le concentrazioni delle eventuali prove in bianco. A tale scopo, si devono utilizzare solventi di estrema purezza, preferibilmente solventi utilizzati per l'analisi dei residui. Inoltre, una pulizia accurata (ad esempio lavaggio con solvente o essiccazione a temperatura elevata) degli strumenti in vetro prima dell'esperimento può diminuire il rischio di contaminazione incrociata.

25. È possibile ottenere una stima del log P_{OW} con un apposito programma o ricorrendo al parere di uno specialista. Se il suo valore è superiore a sei, è necessario prestare molta attenzione alle correzioni in funzione dei bianchi e ai trasferimenti dell'analita da un campione all'altro. D'altro canto, se il log P_{OW} è superiore a 6, è obbligatorio uno standard surrogato per correggere il tasso di recupero, in modo da ottenere fattori di preconcentrazione elevati. Esistono in commercio diversi programmi software per il calcolo della stima del log P_{OW} ad esempio, Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) e ACD log P (19) ([1]). I riferimenti bibliografici (da 20 a 22) descrivono i vari metodi di stima.

26. I limiti di quantificazione (limits of quantification — LOQ) della sostanza in esame in 1-ottanolo e in acqua sono stabiliti secondo metodi riconosciuti. Come principio di base, il limite di quantificazione di un metodo corrisponde alla concentrazione in acqua o in 1-ottanolo che produce un rapporto segnale-disturbo pari a dieci. Occorre scegliere metodi di estrazione e di preconcentrazione adeguati e precisare i recuperi analitici. Occorre scegliere un fattore di preconcentrazione adeguato che produca un segnale dell'intensità richiesta nel corso della determinazione analitica.

([1]) Questa informazione è fornita soltanto a titolo indicativo. Possono essere utilizzati altri software equivalenti se è dimostrato che producono gli stessi risultati.

▼M4

27. In funzione dei parametri del metodo analitico e delle concentrazioni previste, si stabilisce il volume approssimativo del campione che permetterà un'accurata determinazione della concentrazione della sostanza. Per ottenere un segnale analitico sufficiente, è opportuno non utilizzare campioni di acqua troppo esigui. D'altro canto, i campioni di acqua non devono neanche essere troppo grandi, poiché il volume di acqua restante rischia di essere insufficiente per il numero minimo di analisi necessario (n = 5). Nell'appendice 1 sono riportati i volumi minimi dei campioni in funzione del volume del recipiente, il limite di quantificazione della sostanza in esame e la sua solubilità.

28. La quantificazione delle sostanze di prova si effettua per confronto con le curve di calibrazione dei loro composti. Le concentrazioni nei campioni analizzati devono essere comprese tra le concentrazioni degli standard.

29. Per le sostanze in esame il cui log P_{OW} stimato è superiore a sei, occorre aggiungere uno standard surrogato nel campione di acqua prima dell'estrazione per rilevare le perdite che si verificano durante l'estrazione e la preconcentrazione dei campioni di acqua. Affinché la correzione del recupero sia accurata, gli standard surrogati devono avere proprietà molto simili o identiche a quelle della sostanza in esame. A tale scopo, si utilizzano preferibilmente analoghi marcati con isotopi (stabili) della sostanza di prova (perdeuterati o marcati ^{13}C, ad esempio). Se l'utilizzo di analoghi marcati con isotopi stabili (^{13}C o ^{2}H) risulta impossibile, si deve dimostrare, basandosi su dati affidabili tratti da pubblicazioni, che le proprietà fisico-chimiche dello standard surrogato sono molto vicine a quelle della sostanza in esame. Nel corso dell'estrazione liquido-liquido della fase acquosa possono formarsi emulsioni, che possono essere ridotte con l'aggiunta di sale e lasciando decantare l'emulsione tutta la notte. I metodi utilizzati per estrarre e preconcentrare i campioni devono essere riportati nella relazione sulla prova.

30. Prima di essere analizzati, i campioni prelevati dalla fase 1-ottanolo possono, se necessario, essere diluiti con un adeguato solvente. Inoltre, si raccomanda l'utilizzo di standard surrogati per correggere il tasso di recupero per le sostanze che hanno evidenziato un grado di variazione elevato nel corso delle prove di recupero (deviazione standard relativa > 10 %).

31. La relazione sulla prova dovrà contenere i dettagli del metodo analitico, e includere: il metodo di estrazione, i fattori di preconcentrazione e di diluizione, i parametri degli strumenti, il processo di calibrazione, l'intervallo di calibrazione, il recupero analitico della sostanza in esame dall'acqua, l'aggiunta di standard surrogati per correggere il tasso di recupero, i valori delle prove in bianco, i limiti di rivelabilità e i limiti di quantificazione.

Esecuzione della prova

Rapporti volumetrici ottimali 1-ottanolo/acqua

32. La scelta dei volumi di acqua e di 1-ottanolo deve avvenire in funzione degli elementi seguenti: il limite di quantificazione in 1-ottanolo e in acqua, i fattori di preconcentrazione applicati ai campioni di acqua, i volumi di campionamento prelevati in 1-ottanolo e in acqua nonché le concentrazioni previste. Per ragioni sperimentali, il volume di 1-ottanolo nel metodo dell'agitazione lenta deve essere scelto in modo che lo strato di 1-ottanolo sia sufficientemente spesso (> 0,5 cm) da non risultare alterato dopo un campionamento della fase 1-ottanolo.

33. Per determinare i composti il cui log P_{OW} è uguale o superiore a 4,5, il rapporto tra i volumi di ciascuna fase abitualmente utilizzati sono da 20 a 50 ml di 1-ottanolo e da 950 a 980 ml di acqua in un recipiente da un litro.

▼M4

Condizioni sperimentali

34. Durante la prova, al recipiente di reazione è applicato un termostato in modo da limitare la variazione di temperatura a meno di 1 °C. La prova deve essere effettuata a 25 °C.

35. Il sistema sperimentale deve essere protetto dalla luce del giorno, effettuando la prova in una camera oscura o coprendo il recipiente di reazione con un foglio di alluminio.

36. La prova deve essere effettuata in un ambiente (per quanto possibile) privo di polvere.

37. Il sistema 1-ottanolo/acqua è agitato fino al raggiungimento dell'equilibrio. Il tempo necessario per raggiungere l'equilibrio è valutato in un esperimento pilota effettuando una prova ad agitazione lenta durante la quale l'acqua e l'1-ottanolo sono sottoposti periodicamente a campionamento. I campionamenti devono avvenire ad intervalli di almeno cinque ore.

38. La determinazione del P_{OW} deve essere effettuata sulla base di almeno tre prove indipendenti di agitazione lenta.

Determinazione del tempo necessario per raggiungere l'equilibrio

39. Si considera che l'equilibrio sia stato raggiunto quando la regressione del rapporto delle concentrazioni 1-ottanolo/acqua in funzione del tempo (in un arco temporale che comprende quattro punti) si traduce in una pendenza che non si discosta in modo significativo da zero per un livello p uguale a 0,05. Occorre raggiungere l'equilibrio almeno 24 ore prima di poter iniziare il campionamento. In linea di massima, il campionamento delle sostanze il cui log P_{OW} stimato è < 5 può essere effettuato nel corso del secondo e terzo giorno. È possibile che il tempo necessario per giungere all'equilibrio sia più lungo per le sostanze maggiormente idrofobiche. Nel caso di una sostanza con log P_{OW} = 8,23 (decaclorobifenile), sono state sufficienti 144 ore per raggiungere l'equilibrio. L'equilibrio è valutato mediante una serie di campionamenti effettuati dallo stesso recipiente.

Inizio della prova

40. All'inizio della prova, riempire il recipiente di reazione con acqua saturata in 1-ottanolo; attendere quindi che il sistema raggiunga la temperatura termostata.

41. Aggiungere con attenzione al recipiente di reazione la quantità voluta di sostanza in esame (disciolta nel volume richiesto di 1-ottanolo saturato con acqua). Si tratta di un momento critico della prova poiché si deve evitare una miscela turbolenta delle due fasi. A tal fine, la fase 1-ottanolo può essere versata delicatamente con una pipetta sulla parete del contenitore di prova, vicino alla superficie dell'acqua. In tal modo scorrerà lungo la parete formando una pellicola sopra la fase acquosa. Evitare accuratamente di decantare l'1-ottanolo direttamente nella bottiglia; le gocce di 1-ottanolo non devono cadere direttamente nell'acqua.

42. Una volta iniziata la fase di agitazione, aumentare lentamente la velocità. Qualora non sia possibile regolare adeguatamente i motori dell'agitatore, si consideri il ricorso ad un trasformatore. La velocità di agitazione deve essere regolata in modo da creare un vortice nell'interfaccia acqua/1-ottanolo di profondità massima compresa tra 0,5 e 2,5 cm. Occorre diminuire la velocità di agitazione se la profondità del vortice supera 2,5 cm; altrimenti si possono formare microgoccioline di 1-ottanolo nella fase acquosa che determinano una sovrastimazione della concentrazione della sostanza in esame nell'acqua. Sulla base dei risultati di una prova interlaboratorio di convalida (5), si raccomanda di applicare una velocità massima di agitazione di 2,5 cm. Ciò rappresenta un compromesso che permette di giungere rapidamente all'equilibrio pur limitando la formazione di microgoccioline di 1-ottanolo.

▼M4

Prelievo e trattamento dei campioni

43. Prima di effettuare i prelievi, spegnere l'agitatore e attendere che i liquidi si immobilizzino. Una volta effettuato il campionamento, riavviare delicatamente l'agitatore, come sopra descritto, e quindi aumentare progressivamente la velocità di agitazione.

44. I campioni di fase acquosa sono prelevati da un rubinetto posto alla base del recipiente di reazione. Scartare sempre il volume morto di acqua contenuto nei rubinetti (circa 5 ml per il contenitore illustrato nell'appendice 2). L'acqua contenuta nei rubinetti non è stata sottoposta ad agitazione e non è pertanto in equilibrio con il resto del liquido. Prendere nota del volume dei campioni di acqua e, al momento di determinare il bilancio di massa, assicurarsi di tener conto della quantità di sostanza di prova presente nell'acqua eliminata. Ridurre al minimo le perdite dovute a evaporazione facendo scorrere delicatamente l'acqua nell'imbuto separatore in modo da non perturbare lo strato acqua/1-ottanolo.

45. I campioni di 1-ottanolo sono ottenuti aspirando una piccola parte (circa 100 µl) dello strato di 1-ottanolo con una siringa da 100 µl in vetro e metallo, evitando accuratamente di agitare l'interfaccia. Prendere nota del volume di liquido prelevato. È sufficiente una piccola quota, dato che il campione di 1-ottanolo sarà diluito.

46. Si devono evitare i trasferimenti inutili dei campioni. A tal fine è opportuno determinare il volume dei campioni mediante analisi gravimetrica. Nel caso di campioni di acqua, il volume è determinato mediante la raccolta del campione in un imbuto di separazione che contiene già il volume di solvente richiesto.

DATI E RELAZIONE

47. Nel presente metodo di prova il valore P_{OW} è determinato effettuando tre esperimenti ad agitazione lenta (tre unità sperimentali) con il composto in esame, in condizioni sperimentali identiche. La regressione utilizzata per dimostrare il raggiungimento dell'equilibrio deve basarsi sui risultati di almeno quattro determinazioni C_O/C_W effettuate in momenti consecutivi. Ciò consente di calcolare la varianza, come misura dell'incertezza del valore medio ottenuto in ciascuna unità sperimentale.

48. Il P_{OW} può essere caratterizzato dalla varianza dei dati ottenuti in ciascuna unità sperimentale. Tali informazioni sono utilizzate per calcolare il P_{OW} come la media ponderata dei risultati di ciascuna unità sperimentale. A tal fine, come coefficiente di ponderazione è utilizzato l'inverso della varianza dei risultati delle unità sperimentali. Di conseguenza, i dati che presentano una accentuata variazione (espressa in termini di varianza), e che sono pertanto meno affidabili, incideranno in misura minore sul risultato finale rispetto ai dati con varianza limitata.

49. La deviazione standard ponderata è calcolata in modo analogo. Caratterizza la ripetibilità della misurazione del P_{OW}. Una deviazione standard ponderata con valore basso sta a indicare una ripetibilità elevata della determinazione del P_{OW} in uno stesso laboratorio. L'elaborazione statistica formale dei dati è riassunta come illustrato qui di seguito.

▼M4

Trattamento dei risultati

Dimostrazione del conseguimento dell'equilibrio

50. Il logaritmo della relazione delle concentrazioni della sostanza in esame in 1-ottanolo e in acqua (log C_O/C_W) è calcolato per ciascun tempo di prelievo. Il raggiungimento dell'equilibrio chimico si dimostra tracciando una curva di questa relazione in funzione del tempo. Una fase di plateau in questo tracciato, in corrispondenza di almeno quattro punti consecutivi sull'asse del tempo, indica che l'equilibrio è stato raggiunto e che il composto è completamente disciolto in 1-ottanolo. In caso contrario, si deve proseguire la prova fino ad ottenere, per quattro punti consecutivi sull'asse del tempo, una pendenza non significativamente diversa da zero per un livello p uguale a 0,05, che dimostra che il log C_O/C_W è indipendente dal tempo.

Calcolo del log P_{OW}

51. Il valore del log P_{OW} dell'unità sperimentale corrisponde alla media ponderata del logaritmo C_O/C_W per la parte della curva del logaritmo C_O/C_W in funzione del tempo per la quale è stato dimostrato che l'equilibrio è stato raggiunto. Questa media è calcolata ponderando i dati con l'inverso della varianza, in modo che l'influenza dei dati sul risultato finale sia inversamente proporzionale alla loro incertezza.

Media del log P_{OW}

52. Il valore medio del log P_{OW} di varie unità sperimentali corrisponde alla media dei risultati di ciascuna unità sperimentale ponderati con le loro rispettive varianze.

Il calcolo è effettuato secondo la formula seguente:

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

dove:

$\log P_{OW,i}$ = valore log P_{OW} di ciascuna unità sperimentale i;

$\log P_{OW,Av}$ = valore medio ponderato di ciascuna determinazione di log P_{OW};

w_i = ponderazione statistica attribuita al valore log P_{OW} dell'unità sperimentale i.

L'inverso della varianza del log $P_{OW,i}$ è utilizzata come $w_i[w_i = (\text{varlog } P_{OW,i}^{-1})]$.

53. La stima dell'errore della media del log P_{OW} corrisponde alla ripetibilità del log C_O/C_W determinato durante la fase di equilibrio in ciascuna unità sperimentale. È espressa come la deviazione ponderata standard del $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log Pow,Av}$) che a sua volta misura l'errore associato al log $P_{OW,Av}$. La deviazione ponderata può essere calcolata a partire dalla varianza ponderata ($var_{\log Pow,Av}$) nel modo seguente:

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

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

dove «n» rappresenta il numero di unità sperimentali.

▼M4

Relazione sulla prova

54. La relazione sulla prova deve riportare le informazioni seguenti:

Sostanza in esame:

— nome comune, nome chimico, numero CAS, formula strutturale (eventualmente, con indicazione della posizione in caso di sostanze radiomarcate) e proprietà fisico-chimiche pertinenti (cfr. paragrafo 17),

— purezza (impurità) della sostanza in esame,

— purezza radiochimica delle sostanze marcate e attività molare (se del caso),

— stima preliminare del log P_{OW} e metodo utilizzato per calcolare questo valore.

Condizioni sperimentali:

— date di realizzazione degli studi,

— temperatura nel corso dell'esperimento,

— volumi di 1-ottanolo e di acqua all'inizio della prova,

— volumi dei campioni di 1-ottanolo e di acqua prelevati,

— volumi di 1-ottanolo e di acqua che restano nei recipienti di prova,

— descrizione dei recipienti di prova e delle condizioni di agitazione (la geometria della barra di agitazione e del recipiente di prova, altezza del vortice in mm, e quando disponibile:

— metodi analitici utilizzati per determinare la sostanza in esame e loro limite di quantificazione,

— tempi di campionamento,

— pH della fase acquosa e tamponi utilizzati quando si regola il pH in presenza di molecole ionizzabili,

— numero di ripetizioni.

Risultati:

— ripetibilità e sensibilità dei metodi analitici usati,

— concentrazioni della sostanza di prova determinate in 1-ottanolo e in acqua in funzione del tempo,

— dimostrazione del bilancio di massa,

— temperatura e deviazione standard della temperatura o intervallo delle temperature, durante la prova,

— regressione del rapporto delle concentrazioni in funzione del tempo,

— valore medio del log $P_{ow,Av}$ e suo errore standard,

— analisi e interpretazione dei risultati,

▼M4

— esempi di dati grezzi di analisi rappresentative (tutti i dati grezzi devono essere conservati conformemente alle buone pratiche di laboratorio), in particolare il tasso di recupero dei surrogati, il numero di livelli utilizzato nella calibrazione (oltre ai criteri per il coefficiente di correlazione della curva di taratura) e risultati del GQ/CQ,

— se è disponibile: relazione di validazione del protocollo sperimentale (da citare nei riferimenti bibliografici).

BIBLIOGRAFIA:

(1) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the «slow-stirring» method. Environ. Toxicol. Chem., 8: 499-512.

(2) Capitolo A.8 del presente allegato, Coefficiente di partizione.

(3) Capitolo A.8 del presente allegato, Coefficiente di partizione.

(4) OCSE (2000). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Parigi.

(5) Tolls J. (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (P_{OW}) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

(6) Boethling R.S., Mackay D. (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

(7) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

(8) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596-2602.

(9) OCSE (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Parigi.

(10) Capitolo A.6 del presente allegato, Idrosolubilità.

(11) Capitolo C.7 del presente allegato, Degradazione — Idrolisi della degradazione abiotica in funzione del pH.

(12) Capitolo C.4 — parti da II a VII (Metodi da A a F) del presente allegato, Determinazione della pronta biodegradabilità.

(13) Capitolo A.4 del presente allegato, Tensione di vapore.

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

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

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

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

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

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

▼**M4**

(20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.

(21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479-488.

(22) Jübermann O. (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.

▼M4

Appendice 1

Tabelle di calcolo dei volumi minimi di acqua richiesti per l'individuazione delle sostanze in esame con valori log P_{OW} diversi in fase acquosa

Ipotesi:

— Volume massimo di ciascuna aliquota = 10 % del volume totale; 5 aliquote = 50 % del volume totale

— Concentrazione delle sostanze in esame = 0,7 × solubilità in ciascuna fase. Se le concentrazioni sono inferiori, si dovranno utilizzare volumi maggiori

— Volume utilizzato per la determinazione del limite di rivelabilità (LOD) = 100 ml

— Il rapporto del log P_{OW} in funzione di log S_W e del log P_{OW} in funzione di SR (solubilità relativa, S_{oct}/S_w) sono rappresentazioni ragionevoli dei rapporti per le sostanze in esame

Stima di S_w

log P_{ow}	equazione	log S_w	S_w (mg/l)
4	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	0,035	1,084E+00
5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–0,426	3,750E-01
5,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–0,887	1,297E-01
6	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–1,348	4,487E-02
6,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–1,809	1,552E-02
7	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–2,270	5,370E-03
7,5	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–2,731	1,858E-03
8	$(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$	–3,192	6,427E-04

Stima di S_{oc}

log P_{ow}	equazione	S_{oct} (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}49$	2,710E+05

▼**M4**

Massa totale della sostanza in esame (mg)	$Mass_{oct}/Mass_{water}$	$Mass_{H2O}$ (mg)	$Conc_{H2O}$ (mg/l)	$Mass_{oct}$ (mg)	$Conc_{oct}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Calcolo dei volumi

Volume minimo richiesto per la fase H_2O a ciascuna concentrazione del limite di rivelabilità (LOD)

log K_{ow}	LOD (microgrammi/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Volume usato per LOD (l)	0,1					

Legenda

Rappresenta < 10 % del volume totale della fase acquosa, recipiente di equilibrazione da 1 litro.

Rappresenta < 10 % del volume totale della fase acquosa, recipiente di equilibrazione da 2 litri.

Rappresenta < 10 % del volume totale della fase acquosa, recipiente di equilibrazione da 5 litri.

Rappresenta < 10 % del volume totale della fase acquosa, recipiente di equilibrazione da 10 litri.

Supera del 10 % anche il recipiente di equilibrazione da 10 litri.

▼**M4**

Tabella riassuntiva dei volumi necessari, in funzione della solubilità dell'acqua e del Log P_{OW}

Volume minimo richiesto per la fase H_2O ad ogni concentrazione LOD (ml)

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (microgrammi/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

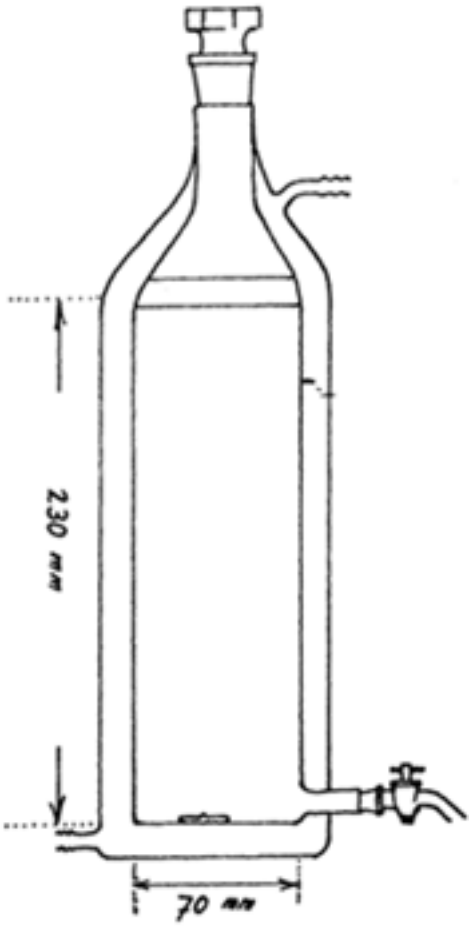
▼**M4**

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (microgrammi/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Volume usato per la determinazione del LOD (l)		0,1					

▼M4

Appendice 2

Esempio di recipiente di prova con rivestimento esterno in vetro per il metodo dell'agitazione lenta al fine di determinare il P_{OW}.



▼M6

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}.

▼M6

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 tensio-attivi. 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):

▼M6

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

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 duplicato.

— Ripetibilità: il valore di log P_{ow} ottenuto da miswurazioni ripetute effettuate nelle stesse condizioni e utilizzando lo stesso gruppo di sostanze di riferimento deve essere nell'intervallo di ± 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 ± 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 ± 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). E' 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.

▼**M6**

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
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	

▼**M6**

	Numero CAS	Sostanza di riferimento	log P_{ow}	pKa
30	1194-65-6	2,6-diclorobenzonitrile	2,6	
31	535-80-8	acido 3-clorobenzoico	2,7	pKa = 3,82
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	
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	

▼M6

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 ritenzione 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 ± 1 °C.

▼M6

Determinazione del tempo morto t_o

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-alchilmetilchetoni) (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 duplicato. 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;

▼M6

— 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.

▼**M6**

(14) C. Hansch and A. J. Leo. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Willey, New York.

(15) C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir. (1982). Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity — Available from Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.

(16) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther.* 14, 479-488.

(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.

▼M6

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:

$$^{\pi}X = \log P_{ow}\,(PhX) - \log P_{ow}\,(PhH)$$

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

$$\begin{aligned} \text{ad esempio } \ ^{\pi}Cl &= \log Pow\,(C_6H_5Cl) — \log P_{ow}\,(C_6H_6) \\ &= 2{,}84 - 2{,}13 \\ &= 0{,}71 \end{aligned}$$

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:

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

▼M6

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).

▼**M6**

(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).

▼M7

A.25. COSTANTI DI DISSOCIAZIONE IN ACQUA (METODO DELLA TITOLAZIONE — METODO SPETTROFOTOMETRICO — METODO CONDUTTIMETRICO)

INTRODUZIONE

Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 112 (1981)

Presupposti

— Metodo analitico adeguato

— Solubilità in acqua

Informazioni generali

— Formula di struttura

— Conducibilità elettrica per il metodo conduttimetrico

Condizioni particolari

— Tutte le prove possono essere eseguite su sostanze di grado analitico o commerciale. Vanno presi in considerazione anche i possibili effetti delle impurità sui risultati.

— Il metodo della titolazione non è adatto per sostanze a bassa solubilità (cfr. *infra*: soluzioni campione).

— Il metodo spettrofotometrico è applicabile soltanto alle sostanze con spettri di assorbimento UV/Vis sufficientemente diversi per le forme dissociate e non dissociate. Questo metodo può essere adatto anche per sostanze a bassa solubilità e dissociazioni non-acido/base, ad esempio la formazione dei complessi.

— Nei casi in cui è possibile utilizzare l'equazione di Onsager, il metodo conduttimetrico può essere utilizzato anche a concentrazioni moderatamente basse e nei casi di equilibri non-acido/base.

Documenti di riferimento

Il presente metodo di prova si basa sui metodi indicati nei riferimenti citati nella sezione «Bibliografia» e nel documento *Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification* dell'EPA, del 18 agosto 1978.

INTRODUZIONE, OGGETTO, PORTATA, PERTINENZA, APPLICAZIONE E LIMITI DI PROVA

La dissociazione di una sostanza in acqua è importante per valutare il suo impatto sull'ambiente. Essa determina la forma della sostanza che, a sua volta, ne determina il comportamento e il trasporto. Può incidere sull'adsorbimento della sostanza chimica nel suolo e nei sedimenti e sull'assorbimento all'interno di cellule biologiche.

Definizioni e unità di misura

La dissociazione è la divisione reversibile in due o più specie chimiche che possono essere ionizzate. Il processo è comunemente indicato dall'equilibrio:

$$RX \rightleftharpoons R^{+} + X^{-}$$

e la costante di equilibrio della concentrazione è:

$$K = \frac{[R^{+}][X^{-}]}{[RX]}$$

Ad esempio, nel caso specifico in cui R è l'idrogeno (la sostanza è un acido), la costante è:

▼M7

$$K_\alpha = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

oppure

$$pK_\alpha = pH - \log\frac{[X^-]}{[HX]}$$

Sostanze di riferimento

Non è necessario utilizzare le seguenti sostanze di riferimento ogni volta che si esamina una nuova sostanza. Esse sono fornite soprattutto affinché la calibrazione del metodo possa essere effettuata periodicamente e che i risultati possano essere confrontati con i risultati ottenuti con altri metodi.

	Costante di dissociazione (pKa) (1)	Temperatura in °C
p-nitrofenolo	7,15	251
acido benzoico	4,12	20
p-cloroanilina	3,93	20

(1) Non è disponibile alcun valore per la temperatura di 20 °C, ma si può ritenere che la variabilità dei risultati della misurazione sia superiore alle variazioni dovute alla temperatura

Sarebbe utile disporre di una sostanza con diversi pK, come indicato nella sezione «Principio del metodo». Una siffatta sostanza potrebbe essere:

Acido citrico	costante di dissociazione (pK_a) (1)	Temp. in °C
	1) 3,14	20
	2) 4,77	20
	3) 6,39	20

Principio del metodo

Il processo chimico descritto dipende generalmente solo in misura ridotta dalla temperatura nell'intervallo delle temperature registrate nell'ambiente. La determinazione della costante di dissociazione implica la misurazione delle concentrazioni delle forme dissociate e non dissociate della sostanza chimica in esame. Conoscendo la stechiometria della reazione di dissociazione indicata nella sezione «Definizioni e unità», si può determinare la costante corrispondente. Nel caso specifico descritto nel presente metodo di prova, la sostanza si comporta come un acido o una base, ed il metodo più facile consiste nel determinare le relative concentrazioni nelle forme ionizzata e non ionizzata della sostanza e il pH della soluzione. Il rapporto tra queste condizioni è dato dall'equazione per pK_a nella sezione «Definizione e unità». Alcune sostanze presentano più di una costante di dissociazione e possono essere sviluppate formule analoghe. Alcuni dei metodi qui descritti si applicano anche alla dissociazione non-acido/base.

Criteri di qualità

Riproducibilità

La costante di dissociazione va replicata (un minimo di tre determinazioni); i valori devono essere compresi in un intervallo di ± 0,1 unità logaritmiche.

DESCRIZIONE DEL METODO

Vi sono due differenti approcci per la determinazione del pK_a. Uno comporta la titolazione di una quantità nota della sostanza con un acido o una base standard, a seconda dei casi; l'altro consiste nel determinare la concentrazione relativa delle forme ionizzata e non ionizzata e la sua dipendenza dal pH.

▼M7

Preparazioni

I metodi basati su questi principi possono essere classificati come metodo della titolazione, metodo spettrofotometrico e metodo conduttimetrico.

Soluzioni campione

Per il metodo della titolazione e quello conduttimetrico, dissolvere la sostanza chimica in esame in acqua distillata. Per il metodo spettrofotometrico e altri metodi sono utilizzate le soluzioni tampone. La concentrazione della sostanza di prova non deve superare il valore minore tra 0,01 M e la metà della concentrazione di saturazione; per la preparazione delle soluzioni utilizzare la sostanza nella forma più pura disponibile. Se è scarsamente solubile, la sostanza può essere disciolta in una piccola quantità di solvente miscibile con l'acqua prima di essere aggiunta alle concentrazioni sopra indicate.

Le soluzioni devono essere sottoposte a controllo per verificare la presenza di emulsioni utilizzando un fascio Tyndall, soprattutto se è stato utilizzato un co-solvente per migliorare la solubilità. Quando si utilizzano soluzioni tampone, la loro concentrazione non deve superare 0,05 M.

Condizioni sperimentali

Temperatura

La temperatura deve essere controllata almeno a ± 1 °C. La determinazione deve essere effettuata, preferibilmente, a 20 °C.

Se si ritiene che i risultati varino in modo significativo in funzione della temperatura, ripetere la determinazione ad almeno altre due temperature. In tal caso, gli intervalli di temperatura devono essere di 10°C, con un controllo di ± 0,1 °C circa.

Analisi

Il metodo sarà determinato dalla natura della sostanza chimica in esame. Esso deve essere sufficientemente sensibile da consentire la determinazione delle diverse specie a ciascuna delle concentrazioni della soluzione campione.

Esecuzione della prova

Metodo della titolazione

La soluzione campione è determinata per titolazione con una soluzione acida o basica standard, secondo il caso. Misurare il pH dopo ogni aggiunta di titolante. Vanno effettuate almeno 10 aggiunte incrementali prima del punto di equivalenza. Se l'equilibrio è raggiunto abbastanza rapidamente, si può utilizzare un potenziometro registratore. Per questo metodo è necessario conoscere con precisione la quantità totale della sostanza e la sua concentrazione. Vanno prese le precauzioni necessarie per escludere la presenza di CO_2. I dettagli della procedura, le misure precauzionali da adottare e il metodo di calcolo sono riportati nelle prove standardizzate, ad esempio nei riferimenti (1), (2), (3) e (4)

Metodo spettrofotometrico

Trovare una lunghezza d'onda in cui le forme ionizzate e non ionizzate della sostanza presentano coefficienti di estinzione significativamente diversi. Lo spettro di assorbimento UV/Vis è ottenuto da soluzioni di concentrazione costante, in condizioni di pH in cui la sostanza è praticamente non ionizzata, completamente ionizzata e a diversi pH intermedi. Ciò può essere ottenuto mediante aggiunta di acido (o di base) concentrato a un volume relativamente significativo di una soluzione della sostanza in un tampone a più componenti, inizialmente a pH elevato (basso) (rif. 5), o aggiungendo volumi uguali della soluzione madre della sostanza stessa, ad esempio in acqua o metanolo, a volumi costanti di varie soluzioni tampone che coprono l'intervallo voluto di pH. A partire dai valori di pH e di assorbanza alla lunghezza d'onda scelta si calcola un numero sufficiente di valori pK_a utilizzando i dati ottenuti per almeno 5 pH diversi ai quali il tasso di ionizzazione della sostanza è compreso tra il 10 e il 90 %. Ulteriori dati sperimentali e metodo di calcolo sono riportati nel riferimento (1).

▼M7

Metodo conduttimetrico

Utilizzando una cella, la cui costante è nota e ridotta, misurare la conducibilità di circa 0,1 M di soluzione della sostanza in acqua. Sono inoltre misurate le conducibilità di alcune diluizioni, accuratamente preparate, di tale sostanza. La concentrazione è dimezzata ogni volta, e la serie deve comprendere almeno un ordine di grandezza di concentrazione. La conducibilità limite a una diluizione infinita è ottenuta eseguendo una sperimentazione simile con il sale di Na e estrapolando. Si può quindi calcolare il grado di dissociazione a partire dalla conducibilità di ciascuna soluzione utilizzando l'equazione di Onsager; successivamente, applicando la legge di diluizione di Ostwald, la costante di dissociazione può essere calcolata con la seguente formula: $K = \alpha^2 C/(1 - \alpha)$, dove C è la concentrazione in moli per litro e α è la frazione dissociata. Vanno prese le precauzioni necessarie per escludere la presenza di CO_2. Ulteriori dati sperimentali e metodo di calcolo sono indicati nei testi di riferimento e nei riferimenti (1), (6) e (7).

DATI E RELAZIONE

Calcolo dei risultati

Metodo per titolazione

Il pK_a è calcolato per 10 punti misurati sulla curva di titolazione. Si calcola la media e la deviazione standard di tali valori pK_a. Vanno inclusi un grafico del pH in funzione del volume di base o acido standard e una presentazione sotto forma di tabella.

Metodi spettrofotometrici

L'assorbanza e il pH sono registrati per ciascuno spettro. Partendo dai punti corrispondenti ai dati relativi agli spettri intermedi si calcolano almeno cinque valori pKa, nonché la media e la deviazione standard dei risultati.

Metodo conduttimetrico

La conducibilità equivalente Λ è calcolata per ciascuna concentrazione dell'acido e per ciascuna concentrazione di una miscela di 1 equivalente di acido più 0,98 equivalente di idrossido di sodio privo di carbonato. L'acido è eccedente per evitare un eccesso di OH^- dovuto all'idrolisi. Si rappresenta graficamente $1/\Lambda$ in funzione di $\sqrt{C}$ e si può trovare il valore Λ_o del sale mediante estrapolazione a concentrazione zero.

Il valore λo dell'acido può essere calcolato utilizzando i valori forniti dalla letteratura per H^+ and Na^+. Il pK_a può essere ricavato dalle formule $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_o$ e $K_a = \alpha^2 C/(1 - \alpha)$ per ciascuna concentrazione. Si possono ottenere valori migliori per K_a procedendo a correzione per la mobilità e l'attività. Calcolare le medie e le deviazioni standard dei valori pK_a.

Relazione sula prova

Tutti i dati grezzi e i valori calcolati per il pK_a devono essere presentati assieme al metodo di calcolo (preferibilmente sotto forma di tabella, come suggerito nel rif. 1) così come i parametri statistici sopra descritti. Per i metodi per titolazione, indicare informazioni dettagliate sui metodi di standardizzazione dei titolanti.

Per i metodi spettrofotometrici, presentare tutti gli spettri. Per il metodo conduttimetrico riportare i dettagli della determinazione della costante di cella. Vanno indicati la tecnica utilizzata, i metodi di analisi e la natura di eventuali tamponi utilizzati.

La o le temperature sperimentali devono essere indicate.

BIBLIOGRAFIA

(1) Albert, A. & Sergeant, E.P.: *Ionization Constants of Acids and Bases,* Wiley, Inc., New York, 1962.

▼**M7**

(2) Nelson, N.H. & Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, Env. Sci. Tech. 3, II, pp. 1186-1188 (1969).

(3) ASTM D 1293 — Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

(4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.

(5) Clark, J. & Cunliffe, A.E.: *Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution*. Chem. Ind. (London) 281, (March 1973).

(6) ASTM D 1125 — *Annual ASTM Standards*, Philadelphia, 1974.

(7) Standard Method 205 — APHA/AWWA/NPCF (see above (4)).

(8) *Handbook of Chemistry and Physics,* 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).

▼B

PARTE B: METODI PER LA DETERMINAZIONE DELLA TOSSICITÀ E DEGLI ALTRI EFFETTI SULLA SALUTE

INDICE

INTRODUZIONE GENERALE

B.1 *bis*. TOSSICITÀ ORALE ACUTA — METODO A DOSE FISSA

B.1 *ter*. TOSSICITÀ ACUTA PER VIA ORALE — METODO DELLA CLASSE DI TOSSICITÀ ACUTA

B.2. TOSSICITÀ ACUTA PER INALAZIONE

B.3. TOSSICITÀ ACUTA PER VIA CUTANEA

B.4. IRRITAZIONE/CORROSIONE CUTANEA ACUTA

B.5. IRRITAZIONE/CORROSIONE OCULARE ACUTA

B.6. SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA

B.7. TOSSICITÀ A DOSE RIPETUTA (28 GIORNI) PER VIA ORALE NEI RODITORI

B.8. TOSSICITÀ SUBACUTA PER INALAZIONE: STUDIO A 28 GIORNI

B.9. TOSSICITÀ A DOSE RIPETUTA (28 GIORNI) PER VIA CUTANEA

B.10. PROVA IN VITRO DI ABERRAZIONE CROMOSOMICA NEI MAMMIFERI

B.11. PROVA DI ABERRAZIONE CROMOSOMICA DEL MIDOLLO OSSEO NEI MAMMIFERI

B.12. PROVA SUI MICRONUCLEI NEGLI ERITROCITI DI MAMMIFERO

B.13/14. MUTAGENICITÀ — TEST DI REVERSIONE SU BATTERI

B.17. PROVA *IN VITRO* DI MUTAZIONE GENICA SU CELLULE DI MAMMIFERO NEI GENI HPRT E XPRT

B.21. SAGGIO *IN VITRO* DI TRASFORMAZIONE DI CELLULE DI MAMMIFERO

B.22. SAGGIO DI LETALITÀ DOMINANTE NEI RODITORI

▼B

B.23. SAGGIO DI ABERRAZIONE CROMOSOMICA SUGLI SPERMATOGONI DI MAMMIFERO

B.25. TRASLOCAZIONI EREDITABILI: TOPO

B.26. TEST DI TOSSICITÀ ORALE SUBCRONICA STUDIO DELLA TOSSICITÀ ORALE CON SOMMINISTRAZIONE RIPETUTA DI DOSI PER 90 GIORNI SUI RODITORI

B.27. TEST DI TOSSICITÀ ORALE SUBCRONICA STUDIO DELLA TOSSICITÀ ORALE CON SOMMINISTRAZIONE RIPETUTA DI DOSI PER 90 GIORNI SUI NON RODITORI

B.28. SAGGIO DI TOSSICITÀ CUTANEA SUBCRONICA SAGGIO CON SOMMINISTRAZIONE CUTANEA RIPETUTA DI DOSI PER 90 GIORNI USANDO SPECIE DI RODITORI

B.29. TOSSICITÀ SUBACUTA PER INALAZIONE: STUDIO A 90 GIORNI

B.30. STUDI DI TOSSICITÀ CRONICA

B.31. STUDIO DI TOSSICITÀ PRENATALE

B.32. STUDI DI CANCEROGENESI

B.33. STUDI COMBINATI DI TOSSICITÀ CRONICA/CANCEROGENESI

B.34. SAGGIO DI TOSSICITÀ SULLA RIPRODUZIONE: UNA GENERAZIONE

B.35. STUDIO DI TOSSICITÀ RIPRODUTTIVA A DUE GENERAZIONI

B.36. TOSSICOCINETICA

B.37. NEUROTOSSICITÀ RITARDATA DI SOSTANZE ORGANOFOSFORICHE DOPO ESPOSIZIONE ACUTA

B.38. NEUROTOSSICITÀ RITARDATA DI SOSTANZE ORGANOFOSFORICHE: STUDIO CON SOMMINISTAZIONE RIPETUTA PER 28 GIORNI

B.39. TEST *IN VIVO* DI SINTESI NON PROGRAMMATA DI DNA (UDS) SU CELLULE EPATICHE DI MAMMIFERO

B.40. CORROSIONE CUTANEA IN VITRO: METODO DI PROVA DELLA RESISTENZA ELETTRICA TRANSCUTANEA (TER)

B.40*bis*. CORROSIONE CUTANEA IN VITRO: METODO DI PROVA SU UN MODELLO DI EPIDERMIDE UMANA RICOSTITUITA (RhE)

B.41. SAGGIO DI FOTOTOSSICITÀ *IN VITRO* 3T3 NRU

B.42. SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA: LOCAL LYMPH NODE ASSAY

▼B

B.43. STUDI DI NEUROTOSSICITÀ NEI RODITORI

B.44. ASSORBIMENTO CUTANEO: METODO *IN VIVO*

B.45. ASSORBIMENTO CUTANEO: METODO *IN VITRO*

B.46. IRRITAZIONE CUTANEA IN VITRO: METODO DI PROVA SU UN MODELLO DI EPIDERMIDE UMANA RICOSTITUITA

B.47. METODO DI PROVA DELL'OPACITÀ E DELLA PERMEABILITÀ DELLA CORNEA NEI BOVINI PER L'IDENTIFICAZIONE DI I) SOSTANZE CHIMICHE CHE INDUCONO GRAVI LESIONI OCULARI E II) SOSTANZE CHIMICHE CHE NON RICHIEDONO CLASSIFICAZIONE PER IRRITAZIONE OCULARE O GRAVI LESIONI OCULARI

B.48. METODO DI PROVA SULL'OCCHIO ISOLATO DEI POLLI (*ISOLATED CHICKEN EYE* — ICE) PER L'IDENTIFICAZIONE DI I) SOSTANZE CHIMICHE CHE INDUCONO GRAVI LESIONI OCULARI E II) SOSTANZE CHIMICHE CHE NON RICHIEDONO CLASSIFICAZIONE PER IRRITAZIONE OCULARE O GRAVI LESIONI OCULARI

B.49. PROVA DEL MICRONUCLEO IN VITRO CON CELLULE DI MAMMIFERO

B.50. SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA: LOCAL LYMPH NODE ASSAY: DA

B.51. SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA: LOCAL LYMPH NODE ASSAY: BrdU-ELISA

B.52. TOSSICITÀ ACUTA PER INALAZIONE — METODO DELLA CLASSE DI TOSSICITÀ ACUTA

B.53. STUDIO DELLA NEUROTOSSICITÀ NELLA FASE DELLO SVILUPPO

B.54. SAGGIO UTEROTROFICO SUI RODITORI: PROVA DI SCREENING A BREVE TERMINE DELLE PROPRIETÀ ESTROGENICHE

B.55. SAGGIO DI HERSHBERGER SUL RATTO: SAGGIO DI SCREENING A BREVE TERMINE DELLE PROPRIETÀ (ANTI)ANDROGENICHE

B.56. STUDIO ESTESO DELLA TOSSICITÀ PER LA RIPRODUZIONE SU UNA GENERAZIONE

B.57. SAGGIO DI STEROIDOGENESI SU H295R

B.58. SAGGI DI MUTAGENESI DI CELLULE SOMATICHE E GERMINALI DI RODITORI TRANSGENICI

B.59. SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA *IN CHEMICO*: SAGGIO DI REATTIVITÀ PEPTIDICA DIRETTA (DPRA)

B.60. SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA IN VITRO: METODO DI PROVA DELLA LUCIFERASI ARE-NRF2

B.61. METODO DI PROVA DI DIFFUSIONE DELLA FLUORESCEINA PER L'INDIVIDUAZIONE DI SOSTANZE CORROSIVE E GRAVEMENTE IRRITANTI PER GLI OCCHI

B.62. TEST DELLA COMETA *IN VIVO* IN CONDIZIONI ALCALINE SU CELLULE DI MAMMIFERI

▼B

B.63. PROVA DI SCREENING DELLA TOSSICITÀ PER LA RIPRODUZIONE/LO SVILUPPO

B.64. STUDIO DI TOSSICITÀ CON DOSE RIPETUTA COMBINATO CON LA PROVA DI SCREENING DELLA TOSSICITÀ PER LA RIPRODUZIONE/LO SVILUPPO

B.65. METODO DI PROVA *IN VITRO* CON MEMBRANA IMPERMEABILE PER LA CORROSIONE CUTANEA

B.66. SAGGI DI TRANSATTIVAZIONE *IN VITRO* TRAMITE TRASFEZIONE STABILE PER L'INDIVIDUAZIONE DI SOSTANZE AGONISTE E ANTAGONISTE DEI RECETTORI ESTROGENICI

B.67. PROVE *IN VITRO* DI MUTAZIONE GENICA SU CELLULE DI MAMMIFERO UTILIZZANDO IL GENE TIMIDINA CHINASI

B.68. METODO DI PROVA DI EPOSIZIONE IN VITRO DI BREVE DURATA PER L'IDENTIFICAZIONE DI i) SOSTANZE CHIMICHE CHE INDUCONO GRAVI LESIONI OCULARI E ii) SOSTANZE CHIMICHE CHE NON RICHIEDONO CLASSIFICAZIONE PER IRRITAZIONE OCULARE O GRAVI LESIONI OCULARI

B.69. METODO DI PROVA SU MODELLO DI EPITELIO CORNEALE UMANO RICOSTITUITO (RhCE) PER L'IDENTIFICAZIONE DELLE SOSTANZE CHIMICHE CHE NON RICHIEDONO CLASSIFICAZIONE NÉ ETICHETTATURA PER IRRITAZIONE OCULARE O GRAVI LESIONI OCULARI

B.70. SAGGIO *IN VITRO* CHE UTILIZZA IL RECETTORE ESTROGENICO RICOMBINANTE UMANO (hrER) PER INDIVIDUARE LE SOSTANZE CHIMICHE CHE PRESENTANO UN'AFFINITÀ DI LEGAME CON I RECETTORI DI ESTROGENI

B.71. PROVE DI SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA *IN VITRO* RIGUARDANTI L'EVENTO CHIAVE NELL'ATTIVAZIONE DI CELLULE DENDRITICHE NEL MECCANISMO D'AZIONE DEGLI EFFETTI AVVERSI (AOP) PER LA SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA

▼B

INTRODUZIONE GENERALE

A. **CARATTERIZZAZIONE DELLA SOSTANZA IN ESAME**

Prima dell'inizio di qualsiasi studio di tossicità occorre conoscere la composizione della sostanza in esame, incluse le impurità principali e le proprietà fisico-chimiche pertinenti, compresa la stabilità.

Le proprietà fisico-chimiche della sostanza in esame forniscono informazioni importanti per la scelta della via di somministrazione, per la progettazione dei vari studi e per il trattamento e la conservazione della sostanza in esame.

L'elaborazione di un metodo analitico per la determinazione qualitativa e quantitativa della sostanza in esame (comprese, se possibile, le principali impurità) nel mezzo di dosaggio e nel materiale biologico deve precedere l'inizio dello studio.

Tutte le informazioni relative all'identificazione, alle proprietà fisico-chimiche, alla purezza e al comportamento della sostanza devono essere riportate nella relazione del saggio.

B. **CURA DEGLI ANIMALI**

Nei saggi di tossicità è indispensabile esercitare un rigoroso controllo delle condizioni ambientali e utilizzare tecniche adeguate per la cura degli animali.

(i) *Condizioni di alloggiamento*

Le condizioni ambientali nei locali o nei recinti degli animali da laboratorio devono essere appropriate per le specie sperimentali. Per ratti, topi e porcellini d'India è indicata una temperatura ambiente di 22 °C ±3 °C con un'umidità relativa del 30-70 %. Per i conigli, la temperatura deve essere di 20 ± 3 °C con un'umidità relativa del 30-70 %.

Talune tecniche sperimentali sono particolarmente sensibili agli effetti della temperatura e, in tali casi, la descrizione del metodo di saggio comprende indicazioni precise sulle condizioni adeguate. In tutti gli studi di tossicità, la temperatura e l'umidità devono essere controllate, registrate e riportate nella relazione finale dello studio.

L'illuminazione deve essere artificiale ed alternare 12 ore di luce e 12 ore di oscurità. Le condizioni di illuminazione devono essere dettagliatamente registrate e riportate nella relazione finale dello studio.

Salvo nel caso in cui venga diversamente specificato nel metodo, gli animali dovranno essere alloggiati in gabbie individuali o contenenti piccoli gruppi dello stesso sesso. In questo caso il numero degli animali non dovrà essere superiore a cinque.

Nelle relazioni sugli esperimenti effettuati su animali dovranno essere indicati il tipo di gabbie utilizzate e il numero di animali alloggiati in ogni gabbia sia durante l'esposizione alla sostanza chimica che durante tutto il periodo successivo di osservazione.

▼B

(ii) *Condizioni di alimentazione*

La dieta deve soddisfare tutte le esigenze nutrizionali della specie utilizzata per il saggio. Qualora le sostanze in esame vengano somministrate agli animali nella loro dieta, il valore nutrizionale degli alimenti potrebbe essere ridotto per effetto dell'interazione tra la sostanza ed un costituente dietetico. Nell'interpretazione dei risultati dei saggi si dovrà tener conto di questa possibilità. Gli animali potranno essere nutriti con diete convenzionali da laboratorio ed abbeverati con acqua a sazietà. La scelta della dieta potrà essere condizionata dalla necessità di garantire un apporto adeguato della sostanza in esame, qualora essa venga somministrata con gli alimenti.

I contaminanti dietetici suscettibili di influenzare la tossicità non dovrebbero essere presenti in condizioni tali da causare interferenze.

C. **METODI ALTERNATIVI**

L'Unione europea è impegnata a sviluppare e collaudare tecniche alternative che consentano di ottenere lo stesso livello di informazioni degli attuali esperimenti su animali, riducendo tuttavia il numero di animali utilizzati e le sofferenze ad essi inflitte o evitando del tutto il ricorso agli animali.

Non appena perfezionati, tali metodi dovranno costituire, ove possibile, la scelta d'elezione per gli studi miranti alla caratterizzazione dei rischi e alla conseguente classificazione ed etichettatura delle sostanze in funzione dei rischi intrinseci.

D. **VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE**

Nella valutazione ed interpretazione dei saggi occorre tener conto dei limiti entro i quali i risultati di studi su animali e in vitro possono essere estrapolati direttamente all'uomo; laddove si abbia evidenza di effetti avversi per l'uomo, questa potrà essere utilizzata per confermare i risultati sperimentali.

E. **RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

La maggior parte di detti metodi è stata messa a punto nell'ambito del programma per la definizione di linee guida elaborato dall'OCSE in materia di saggi. Essi dovranno essere applicati in conformità con i principi delle buone pratiche di laboratorio allo scopo di garantire il più possibile il «reciproco riconoscimento dei dati».

Ulteriori informazioni sono reperibili nei riferimenti citati nelle linee guida dell'OCSE e nell'ampia letteratura esistente in materia.

▼B

B.1. *bis.* **TOSSICITÀ ORALE ACUTA — METODO A DOSE FISSA**

1. **METODO**

Questo metodo di prova è equivalente al metodo OCSE TG 420 (2001)

1.1. INTRODUZIONE

I metodi tradizionali di valutazione della tossicità acuta utilizzano come *endpoint* la morte degli animali. Nel 1984, la *British Toxicology Society* ha proposto un nuovo metodo, basato sulla somministrazione di una serie di dosi fisse (1), che invece di utilizzare come *endpoint* la morte degli animali prevede l'osservazione di segni evidenti di tossicità in seguito alla somministrazione di una dose facente parte di una serie prestabilita. In seguito a studi di validazione *in vivo* eseguiti nel Regno Unito (2) e a livello internazionale (3), il procedimento è stato adottato come metodo di prova nel 1992. Successivamente, le proprietà statistiche del metodo a dose fissa sono state oggetto di valutazione in una serie di studi basati sull'impiego di modelli matematici (4)(5)(6). Sia gli studi *in vivo* sia quelli di modellizzazione hanno dimostrato che il procedimento è riproducibile, utilizza un minor numero di animali provocando meno sofferenze rispetto ai metodi tradizionali, e permette di classificare le sostanze in maniera analoga agli altri metodi di prova della tossicità acuta.

Per indicazioni sulla scelta del metodo di prova più adatto per un determinato scopo, si rimanda alle linee guida OCSE sui test di tossicità orale acuta (7), che contengono ulteriori informazioni sull'esecuzione e sull'interpretazione del metodo di prova B.1 *bis*.

Il metodo prevede che nello studio principale si utilizzino solo dosi a moderata tossicità, evitando di somministrare dosi che possano avere un effetto letale. Inoltre non è necessario somministrare dosi che provocano notoriamente dolore e sofferenze gravi per effetto dell'azione corrosiva o fortemente irritante. Gli animali moribondi o che manifestano dolore evidente o segni di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia e ai fini dell'interpretazione dei risultati devono essere assimilati agli animali morti durante lo svolgimento del test. I criteri da applicare per decidere la soppressione degli animali moribondi o in stato di grave sofferenza sono oggetto di specifiche linee guida, che indicano anche come riconoscere i segni di morte prevedibile o imminente (8).

Il metodo fornisce informazioni sulla pericolosità della sostanza esaminata, permettendone la classificazione secondo il GHS *(Global Harmonized System),* sistema armonizzato su scala mondiale per la classificazione delle sostanze chimiche che causano tossicità acuta (9).

Prima di effettuare lo studio, il laboratorio che esegue il test deve consultare tutte le informazioni disponibili sulla sostanza di prova, tra cui l'identità e la struttura chimica, le proprietà chimico-fisiche, i risultati di eventuali altri test di tossicità *in vitro* o *in vivo* eseguiti sulla sostanza, i dati tossicologici su sostanze strutturalmente affini, l'impiego o gli impieghi previsti. Queste informazioni sono necessarie per provare a tutti i soggetti interessati l'adeguatezza del test per la protezione della salute umana e servono a scegliere la giusta dose iniziale.

▼B

1.2. DEFINIZIONI

Tossicità orale acuta: effetti avversi che si verificano in seguito alla somministrazione orale di una singola dose o di più dosi di una sostanza nell'arco di 24 ore.

Morte tardiva: termine usato per indicare che l'animale non muore né appare moribondo nelle 48 ore successive alla somministrazione, ma muore successivamente, durante il periodo di osservazione di 14 giorni.

Dose: quantità di sostanza somministrata. Viene espressa in peso della sostanza di prova per unità di peso dell'animale sottoposto al test (ad es. mg/kg).

Tossicità manifesta: termine generale che indica la presenza di chiari segni di tossicità in seguito alla somministrazione della sostanza di prova [per alcuni esempi, cfr. (3)], tali da far prevedere alla dose fissa immediatamente superiore manifestazioni di dolore intenso e segni persistenti di grave sofferenza, uno stato di agonia [i criteri che definiscono tale stato sono illustrati nelle linee guida OCSE citate in bibliografia al n. (8)] o la morte della maggior parte degli animali.

GHS (Globally Harmonized System): sistema armonizzato globale per la classificazione delle sostanze e delle miscele chimiche. Si tratta di un'iniziativa congiunta dell'OCSE (salute umana e ambiente), del Comitato di esperti delle Nazioni Unite sul trasporto delle merci pericolose (proprietà fisico-chimiche) e dell'Organizzazione internazionale del lavoro (comunicazione del rischio), coordinata dal programma IOMC per la gestione ottimale delle sostanze chimiche *(Inter-organization programme for the sound management of chemicals).*

Morte imminente: stato in cui si prevede l'agonia o la morte dell'animale prima della successiva osservazione in programma. Per i roditori tra i segni indicativi di morte imminente figurano le convulsioni, la posizione laterale o prona e il tremore [per maggiori indicazioni, cfr. le linee guida OCSE citate in bibliografia al n. (8)].

DL_{50} (dose letale 50): la singola dose di sostanza, determinata statisticamente, capace di provocare la morte del 50 % degli animali a cui viene somministrata per via orale. Il valore della DL_{50} viene espresso in peso della sostanza di prova per unità di peso dell'animale usato per il saggio (mg/kg).

Dose limite: dose corrispondente al limite superiore fissato per il test (2 000 o 5 000 mg/kg).

Stato di agonia: fase in cui l'animale è moribondo o non è in grado di sopravvivere, nemmeno se sottoposto a trattamento [per maggiori indicazioni, cfr. le linee guida OCSE citate in bibliografia al n.(8)].

Morte prevedibile: presenza di segni clinici, come ad esempio l'incapacità di raggiungere il cibo o l'acqua, che indicano che l'animale morirà prima della conclusione programmata dell'esperimento [per maggiori indicazioni, cfr. le linee guida OCSE citate in bibliografia al n. (8)].

▼B

1.3. PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA

La sostanza viene somministrata a gruppi di animali dello stesso sesso seguendo un procedimento articolato in più fasi successive che prevede la somministrazione di dosi fisse di 5, 50, 300 e 2 000 mg/kg (in casi eccezionali può essere prevista una dose fissa aggiuntiva di 5 000 mg/kg: cfr. punto 1.6.2). Il livello di dose iniziale è scelto sulla base di uno studio di osservazione, ed è la dose alla quale si prevede che si manifestino alcuni segni di tossicità, senza tuttavia causare effetti tossici gravi o la morte degli animali. I segni clinici e le condizioni associate a dolore, sofferenza e morte imminente sono descritti in apposite linee guida OCSE (8). A seconda della presenza o dell'assenza di segni di tossicità o mortalità, la sostanza in esame può essere somministrata ad altri gruppi di animali a dosi superiori o inferiori. La procedura prosegue fino a quando viene identificata la dose che causa tossicità manifesta o la morte di un solo animale o fino alla somministrazione della dose più elevata, se non vengono riscontrati effetti, mentre viene immediatamente interrotta se si verificano decessi alla dose più bassa.

1.4. DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

1.4.1. **Scelta delle specie animale**

È preferibile utilizzare il ratto, ma è possibile ricorrere anche ad altre specie di roditori. Normalmente vengono utilizzati animali di sesso femminile (7), perché la letteratura esistente sui test convenzionali DL_{50} indica che, pur non essendovi grandi differenze di sensibilità tra i due sessi, nei casi in cui sono state osservate differenze in genere le femmine sono risultate leggermente più sensibili (10). Tuttavia se le informazioni disponibili sulle proprietà tossicologiche o tossicocinetiche di sostanze chimiche strutturalmente affini indicano la probabilità che i maschi siano più sensibili delle femmine, si devono utilizzare animali di sesso maschile. In quest'ultimo caso, occorre fornire un'adeguata giustificazione.

Si devono utilizzare animali adulti giovani e sani, appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. All'inizio del trattamento ciascun animale deve avere un'età compresa tra 8 e 12 settimane ed un peso del ± 20 % del peso medio degli animali a cui è già stata somministrata la sostanza.

1.4.2. **Condizioni di stabulazione e di alimentazione**

La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve essere preferibilmente del 50-60 %; in ogni caso non deve essere inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale, alternando 12 ore di luce e 12 ore di oscurità. Per l'alimentazione si possono utilizzare diete convenzionali da laboratorio con acqua ad libitum. Nelle gabbie, gli animali possono essere raggruppati in funzione della dose somministrata, ma il numero di animali per gabbia non deve impedire la corretta osservazione di ciascun esemplare.

1.4.3. **Preparazione degli animali**

Gli animali sono scelti in modo casuale, marchiati per consentire l'individuazione dei singoli esemplari e tenuti nelle gabbie per almeno 5 giorni prima dell'inizio del trattamento, in modo da consentirne l'acclimatazione alle condizioni di laboratorio.

▼B

1.4.4. **Preparazione delle dosi**

In genere la sostanza di prova va somministrata a volume costante per tutte le dosi, variando la concentrazione del preparato da somministrare. Tuttavia, se il test viene eseguito su prodotti o miscele allo stato liquido, ai fini della valutazione del rischio può essere opportuno usare la sostanza non diluita, cioè a concentrazione costante; alcune autorità di regolamentazione impongono obbligatoriamente l'uso della sostanza non diluita. In ogni caso, non deve essere superato il volume massimo della dose somministrabile. Il volume massimo di liquido somministrabile in una sola volta dipende dalla taglia dell'animale, e nei roditori non deve di norma superare 1 ml/100 g di peso corporeo, tranne nel caso delle soluzioni acquose, per le quali si possono prevedere 2 ml/100 g di peso corporeo. Quanto alla formulazione del preparato da somministrare, si raccomanda di usare ove possibile una soluzione/sospensione/emulsione acquosa, seguita in ordine di preferenza da una soluzione/sospensione/emulsione in olio (per esempio olio di mais) e infine da una soluzione in altri veicoli. Per i veicoli diversi dall'acqua devono essere note le caratteristiche tossiche. Le dosi devono essere preparate poco prima della somministrazione, tranne nel caso in cui la stabilità del preparato nell'arco del periodo di utilizzo sia nota e ritenuta accettabile.

1.5. PROCEDIMENTO

1.5.1. **Somministrazione delle dosi**

La sostanza da esaminare viene somministrata in un'unica dose mediante sonda gastrica o apposita cannula per intubazione. Nel remoto caso in cui non sia possibile somministrare l'intera quantità in un'unica dose, ques'ultima può essere frazionata e somministrata in un arco di tempo non superiore a 24 ore.

Prima della somministrazione della sostanza gli animali devono essere tenuti a digiuno (ad esempio, l'alimentazione, a esclusione dell'acqua, deve essere sospesa a partire dalla sera precedente per i ratti e per 3-4 ore nei topi). Dopo il periodo di digiuno, si pesano gli animali e si somministra la sostanza da esaminare. A somministrazione avvenuta, l'alimentazione può essere sospesa per altre 3-4 ore nei ratti o 1-2 ore nei topi. Qualora la dose venga frazionata e somministrata nell'arco di un certo periodo di tempo, a seconda della durata del periodo di somministrazione può essere necessario alimentare e abbeverare gli animali.

1.5.2. **Studio di osservazione**

Lo scopo dello studio di osservazione è di consentire la scelta della giusta dose iniziale per lo studio principale. La sostanza in esame viene somministrata in maniera sequenziale a singoli animali, secondo il diagramma di flusso riportato nell'allegato 1. Lo studio di osservazione si conclude quando è possibile decidere la dose iniziale da utilizzare nello studio principale (o se la dose fissa più bassa provoca la morte di un animale).

La dose iniziale da utilizzare nello studio di osservazione, scelta tra i livelli di dose fissi di 5, 50, 300 e 2 000 mg/kg, è la dose che si prevede possa provocare tossicità manifesta sulla base, ove possibile, di dati *in vivo* e *in vitro* relativi alla stessa sostanza chimica e a sostanze di struttura affine. In mancanza di questi dati, si utilizza una dose iniziale di 300 mg/kg.

Tra le somministrazioni a ciascun animale devono trascorrere almeno 24 ore. Tutti gli animali devono essere tenuti in osservazione per almeno 14 giorni.

▼B

In casi eccezionali, e solo se giustificato da specifiche esigenze normative, può essere previsto un ulteriore livello di dose fisso pari a 5 000 mg/kg (cfr. allegato 3). Per il benessere degli animali, si sconsiglia di effettuare sperimentazioni su animali alla dose stabilita per la categoria GHS 5 (2 000-5 000 mg/kg); l'utilizzo di questa dose va preso in considerazione solo se vi è una probabilità elevata che i risultati del test abbiano rilevanza diretta per la tutela della salute umana o animale o per la protezione dell'ambiente.

Se la somministrazione della dose fissa più bassa (5 mg/kg) provoca la morte dell'animale nel corso dello studio di osservazione, la procedura normale prevede l'interruzione dello studio e l'assegnazione della sostanza alla categoria GHS 1 (cfr. allegato 1). Tuttavia, qualora sia necessaria un'ulteriore conferma della classificazione, può essere utilizzata la seguente procedura supplementare facoltativa: la sostanza viene somministrata a un secondo animale alla dose di 5 mg/kg; se questo secondo animale muore, viene confermata la classificazione nella categoria GHS 1 e lo studio viene immediatamente interrotto; se invece sopravvive, la sostanza viene somministrata alla dose di 5 mg/kg a non più di altri tre animali. A causa dell'elevato rischio di mortalità, per proteggere gli animali la sostanza esaminata deve essere somministrata in maniera sequenziale. L'intervallo di tempo tra le somministrazioni ai diversi animali deve essere sufficiente ad accertare che l'animale trattato in precedenza riesca a sopravvivere. Se si verifica un secondo decesso, la sequenza deve essere immediatamente interrotta e la sostanza non deve essere somministrata ad altri animali. Dal momento che il verificarsi di un secondo decesso (indipendentemente dal numero di animali a cui è già stata somministrata la sostanza al momento dell'interruzione) rientra nel risultato A (2 o più decessi), si applica la regola di classificazione di cui all'allegato 2 alla dose fissa di 5 mg/kg (categoria 1 se vi sono 2 o più morti o categoria 2 se c'è un'unica morte). L'allegato 4 riporta la classificazione prevista dal sistema UE in attesa dell'applicazione del nuovo sistema GHS.

1.5.3. **Studio principale**

1.5.3.1. *Numero di animali e livelli di dose*

I diagrammi di flusso di cui all'allegato 2 illustrano le tappe da seguire dopo la somministrazione del livello di dose iniziale. Vi sono tre possibilità: interrompere il test e assegnare la sostanza alla classe di rischio appropriata; effettuare il test a una dose fissa superiore; effettuare il test a una dose fissa inferiore. Tuttavia, per salvaguardare gli animali, se un livello di dose ha causato la morte di un animale durante lo studio di osservazione, questo livello non deve più essere utilizzato nello studio principale (cfr. allegato 2). L'esperienza indica che dopo la somministrazione del livello di dose iniziale in genere è possibile classificare la sostanza senza bisogno di effettuare ulteriori test.

Per ciascun livello di dose, normalmente si usano in tutto cinque animali dello stesso sesso: l'animale a cui nello studio di osservazione è stato somministrato lo stesso livello di dose, più altri quattro animali (tranne nel caso remoto in cui un livello di dose utilizzato nello studio principale non sia stato incluso nello studio di osservazione).

L'intervallo di tempo tra le somministrazioni dei vari livelli di dose ai diversi animali viene determinato in funzione della comparsa, della durata e della gravità dei segni di tossicità, avendo cura di procedere alla somministrazione della dose successiva solo una volta accertata la sopravvivenza degli animali trattati precedentemente. Si consiglia di far trascorrere, se necessario, 3 o 4 giorni tra le somministrazioni per consentire l'osservazione di eventuali segni di tossicità tardiva. L'intervallo di tempo può essere modificato secondo necessità, ad esempio in caso di risposte non convincenti.

▼B

Quando si prevede di utilizzare una dose fissa superiore di 5 000 mg/kg, è necessario attenersi alla procedura descritta nell'allegato 3 (cfr. anche punto 1.6.2).

1.5.3.2. *Saggio limite*

Il saggio limite viene utilizzato principalmente quando lo sperimentatore dispone di informazioni che indicano che la sostanza in esame non è probabilmente tossica, cioè causa tossicità solo in dosi superiori alle dosi limite previste per legge. Le informazioni sulla tossicità della sostanza in esame possono essere ricavate da test su composti, miscele o prodotti simili, tenendo conto dell'identità e della percentuale dei componenti dei quali è nota la rilevanza tossicologica. Se le informazioni sulla tossicità della sostanza sono scarse o nulle o si prevede che la sostanza in esame sia tossica occorre eseguire lo studio principale.

Ai fini delle presenti linee-guida, per il saggio limite si utilizza, seguendo il procedimento normale, una dose iniziale di 2 000 mg/kg (o in casi eccezionali 5 000 mg/kg) nello studio di osservazione, quindi si somministra la stessa dose ad altri quattro animali.

1.6. OSSERVAZIONI

Dopo la somministrazione, gli animali sono esaminati individualmente almeno una volta nei primi 30 minuti, quindi periodicamente nelle prime 24 ore, prestando particolare attenzione alle prime 4 ore, e successivamente una volta al giorno per 14 giorni, a meno che non muoiano o non sia necessario ritirarli dallo studio e sottoporli a eutanasia per risparmiare loro sofferenze eccessive. Tuttavia, la durata del periodo di osservazione non è tassativa, ma va stabilita in funzione della natura delle reazioni tossiche, del momento della loro comparsa e dei tempi di recupero e può quindi essere prolungata in caso di necessità. Un parametro importante è rappresentato dal momento della comparsa e della scomparsa dei segni di tossicità, soprattutto se questi ultimi tendono ad apparire tardivamente (11). Tutte le osservazioni devono essere sistematicamente registrate su schede individuali per ogni animale.

Qualora gli animali presentino segni persistenti di tossicità sono necessarie ulteriori osservazioni, che devono riguardare le modificazioni della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose, del sistema respiratorio e circolatorio, del sistema nervoso autonomo e centrale, dell'attività somatomotoria e del comportamento. Particolare attenzione deve essere rivolta all'osservazione di tremori, convulsioni, salivazione, diarrea, letargia, sonno e coma. Si devono tenere in considerazione i principi e i criteri riassunti nelle linee guida OCSE citate in bibliografia al punto (8). Gli animali agonizzanti o che manifestano dolore intenso o segni di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia. Nel caso di animali sottoposti a eutanasia o rinvenuti morti, occorre registrare con la massima precisione possibile il momento del decesso.

1.6.1. **Peso corporeo**

1 singoli animali devono essere pesati poco prima della somministrazione della sostanza di prova e in seguito almeno una volta alla settimana. Occorre calcolare e registrare le variazioni ponderali. Al termine del test, gli animali sopravvissuti devono essere pesati prima di essere sottoposti a eutanasia.

▼B

1.6.2. **Esame patologico**

Tutti gli animali utilizzati (compresi quelli che muoiono nel corso del test e quelli che sono ritirati dallo studio per risparmiare loro eccessive sofferenze) devono essere sottoposti a necroscopia macroscopica. Per ogni animale devono essere registrate tutte le modificazioni patologiche di rilievo. Per gli animali sopravvissuti almeno 24 ore, può essere opportuno l'esame microscopico degli organi recanti alterazioni patologiche evidenti, che potrebbe fornire indicazioni utili.

2. **DATI**

Occorre fornire risultati individuali per ciascun animale. Tutti i dati devono essere riassunti in una tabella nella quale devono essere indicati per ciascun gruppo sottoposto al test il numero di animali utilizzati, il numero di animali che hanno manifestato segni di tossicità, il numero di animali rinvenuti morti durante il test o sottoposti a eutanasia, il momento del decesso di ciascun animale, la descrizione degli effetti tossici, il loro decorso e l'eventuale reversibilità e i risultati della necroscopia.

3. **PRESENTAZIONE DEI DATI**

3.1. RAPPORTO DI PROVA

Il rapporto di prova deve contenere le seguenti informazioni, a seconda dei casi:

Sostanza di prova:

— natura fisica, purezza e (se pertinenti) proprietà fisico-chimiche (compresa 1'isomerizzazione),

— dati identificativi, compreso il numero CAS.

Veicolo (se pertinente):

— motivazione della scelta del veicolo utilizzato, se diverso dall'acqua.

Animali da esperimento:

— specie/ceppo utilizzato,

— condizioni microbiologiche degli animali, qualora siano note,

— numero, età e sesso degli animali (compresa l'eventuale giustificazione dell'uso di esemplari maschi anziché femmine),

— provenienza, condizioni di stabulazione, dieta ecc.

Condizioni del test:

— informazioni dettagliate sulla formulazione della sostanza di prova, comprese informazioni sullo stato fisico del preparato somministrato,

— modalità di somministrazione della sostanza di prova, compreso il volume delle dosi e l'orario di somministrazione,

— informazioni dettagliate sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo di dieta/provenienza degli alimenti, provenienza dell'acqua),

— motivazione della scelta della dose iniziale.

▼B

Risultati:

— tabella con risposta e livello di dose per ciascun animale (animali che manifestano segni di tossicità, mortalità compresa; natura, gravità e durata degli effetti),

— tabella del peso corporeo e delle variazioni ponderali,

— peso dei singoli animali nel giorno della somministrazione, e in seguito ad intervalli di una settimana e al momento della morte o del sacrificio,

— data e ora della morte, se questa avviene prima del sacrificio programmato,

— momento della comparsa dei segni di tossicità, decorso ed eventuale reversibilità per ciascun animale,

— referto necroscopico e referto istopatologico per ciascun animale, se disponibili.

Discussione e interpretazione dei risultati.

Conclusioni.

4. **RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). *Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity.* Human Toxicol., 3, 85-92.

(2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). *Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity.* Human Toxicol., 62, 79-291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). *The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test.* Fd. Chem. Toxicol. 28, 469-482.

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

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

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

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

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

▼B

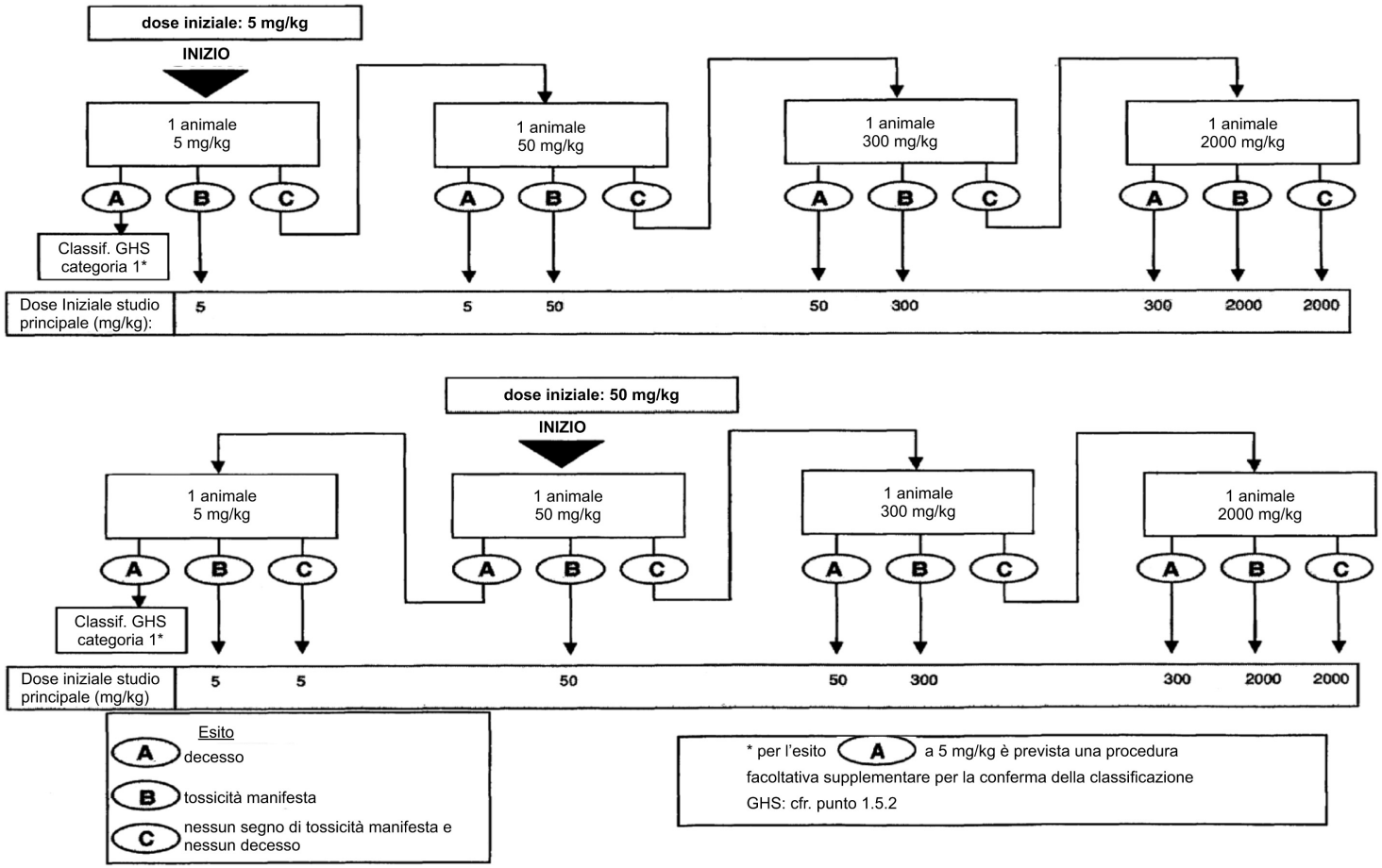
(9) OECD (1998). *Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances,* Approvato alla 28ª riunione congiunta del Chemicals Committee e del Working Party on Chemicals nel novembre 1998, parte 2, pag. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). *Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD_{50}, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures.* Fd. Chem. Toxicol. 33, 223-231.

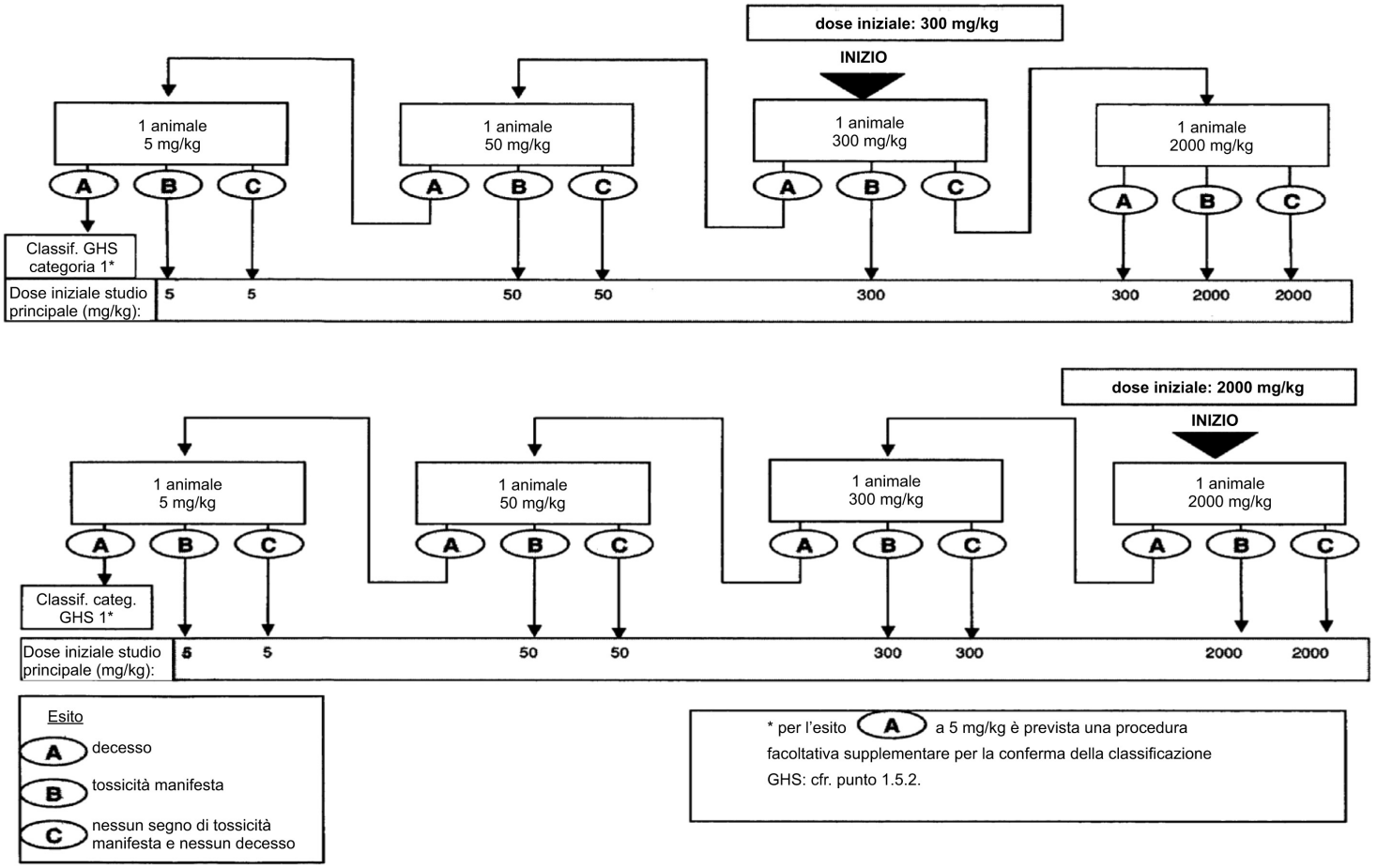
(11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Cap. 16 Acute Toxicity and Eye Irritation, in A.W. Hayes (a cura di), *Principles and Methods of Toxicology,* terza edizione, Raven Press, Ltd. New York, USA.

ALLEGATO 1:

DIAGRAMMA DI FLUSSO DELLO STUDIO DI OSSERVAZIONE

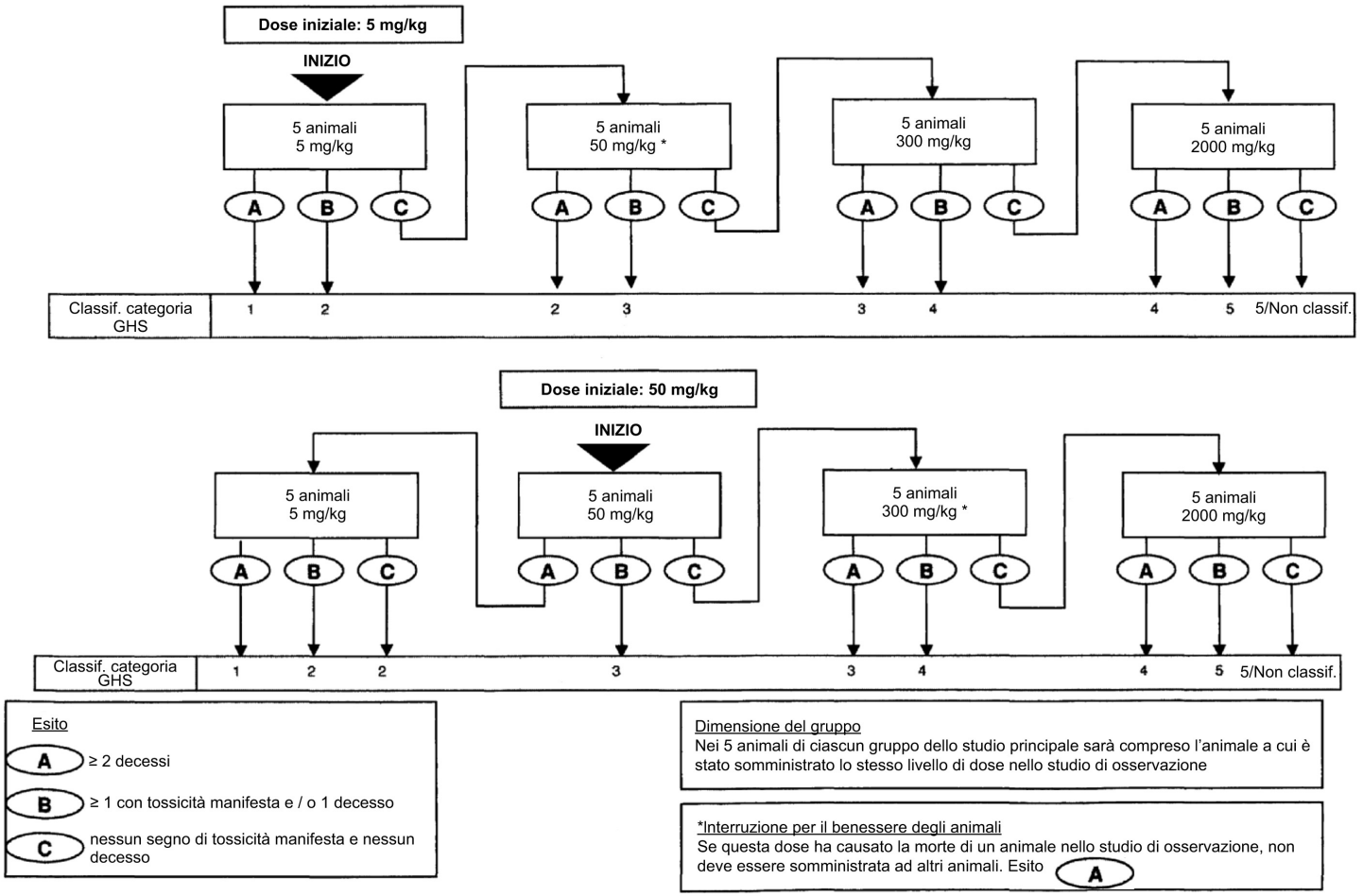


▼B

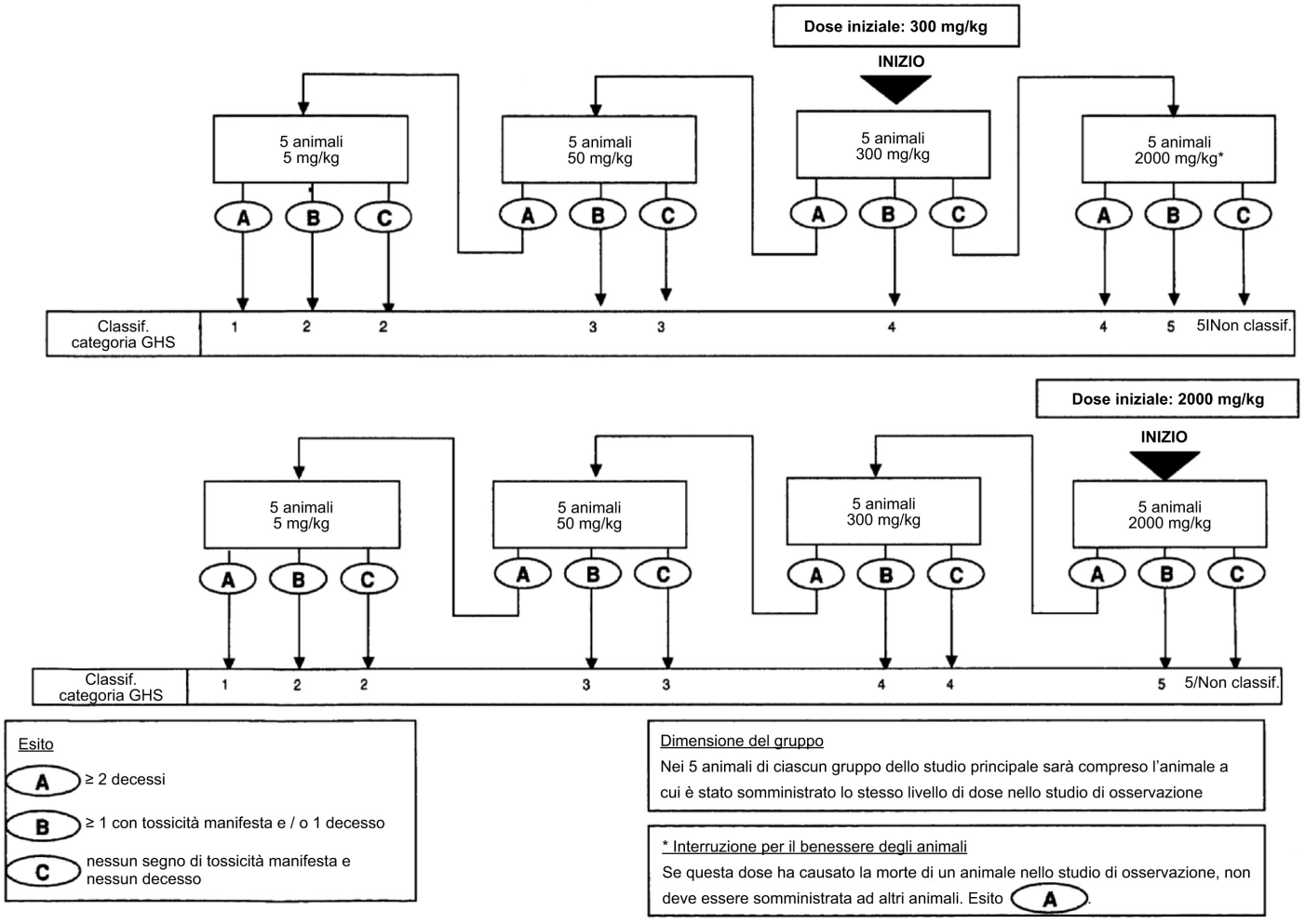

dose iniziale: 300 mg/kg
INIZIO
1 animale 5 mg/kg
1 animale 50 mg/kg
1 animale 300 mg/kg
1 animale 2000 mg/kg
A
B
C
Classif. GHS categoria 1*
Dose iniziale studio principale (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
dose iniziale: 2000 mg/kg
INIZIO
1 animale 5 mg/kg
1 animale 50 mg/kg
1 animale 300 mg/kg
1 animale 2000 mg/kg
Classif. categ. GHS 1*
Dose iniziale studio principale (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Esito
A decesso
B tossicità manifesta
C nessun segno di tossicità manifesta e nessun decesso
* per l'esito A a 5 mg/kg è prevista una procedura facoltativa supplementare per la conferma della classificazione GHS: cfr. punto 1.5.2.

ALLEGATO 2:

DIAGRAMMA DI FLUSSO DELLO STUDIO PRINCIPALE



▼B


Dose iniziale: 300 mg/kg
INIZIO
5 animali 5 mg/kg
5 animali 50 mg/kg
5 animali 300 mg/kg
5 animali 2000 mg/kg*
A B C
Classif. categoria GHS
1 2 2 3 3 4 4 5 5INon classif.
Dose iniziale: 2000 mg/kg
INIZIO
5 animali 5 mg/kg
5 animali 50 mg/kg
5 animali 300 mg/kg
5 animali 2000 mg/kg
Classif. categoria GHS
1 2 2 3 3 4 4 5 5/Non classif.
Esito
A ≥ 2 decessi
B ≥ 1 con tossicità manifesta e / o 1 decesso
C nessun segno di tossicità manifesta e nessun decesso
Dimensione del gruppo
Nei 5 animali di ciascun gruppo dello studio principale sarà compreso l'animale a cui è stato somministrato lo stesso livello di dose nello studio di osservazione
* Interruzione per il benessere degli animali
Se questa dose ha causato la morte di un animale nello studio di osservazione, non deve essere somministrata ad altri animali. Esito A.

▼B

Allegato 3

CRITERI PER LA CLASSIFICAZIONE DI SOSTANZE CON VALORI PREVISTI DI LD_{50} SUPERIORI A 2 000 MG/KG PER LE QUALI NON È NECESSARIO ESEGUIRE IL TEST DI TOSSICITÀ

I criteri relativi alla categoria di rischio 5 servono a consentire l'identificazione di sostanze che presentano un rischio di tossicità acuta relativamente basso ma che in determinate circostanze possono rappresentare un pericolo per popolazioni vulnerabili. Si tratta di sostanze per le quali è prevista una DL_{50} orale o cutanea compresa fra 2 000 e 5 000 mg/kg o dosi equivalenti per altre vie di somministrazione. Una sostanza può essere classificata nella categoria di rischio definita da: 2 000 mg/kg < DL_{50} < 5 000 mg/kg (categoria 5 nel GHS) nei seguenti casi:

a) se uno qualsiasi degli schemi di cui all'allegato 2 porta a inserire tale sostanza in questa categoria, sulla base delle incidenze di mortalità;

b) se sono già disponibili prove attendibili che indicano che la DL_{50} si situa nell'intervallo di valori della categoria 5 o se altri studi su animali o sugli effetti tossici nell'uomo indicano un rischio di tossicità acuta per la salute umana;

c) per estrapolazione, stima o misurazione di dati se non è giustificata l'assegnazione ad una classe di rischio superiore, e se:

— sono disponibili informazioni attendibili che indicano effetti tossici significativi nell'uomo, o

— si osserva mortalità nei test eseguiti fino ai valori della categoria 4 per via orale, o

— i pareri degli esperti confermano segni clinici significativi di tossicità nei test eseguiti fino ai valori della categoria 4, a esclusione di diarrea, piloerezione o aspetto non tolettato, o

— i pareri degli esperti confermano l'esistenza di informazioni attendibili, ricavate dagli altri studi su animali, che indicano potenziali effetti acuti significativi.

ESECUZIONE DEL TEST A DOSI SUPERIORI A 2 000 MG/KG

In casi eccezionali, e solo se specifiche esigenze normative lo giustificano, può essere previsto un ulteriore livello di dose fisso superiore pari a 5 000 mg/kg. Al fine di proteggere gli animali, si sconsiglia di utilizzare la dose di 5 000 mg/kg, che va presa in considerazione solo nel caso in cui sia molto probabile che i risultati del test abbiano rilevanza diretta per la protezione della salute degli animali o degli esseri umani.

Studio di osservazione

Ai criteri decisionali che regolano la procedura sequenziale di cui all'allegato 1 viene aggiunto un livello di dose di 5 000 mg/kg. Di conseguenza, quando nello studio di osservazione si utilizza una dose iniziale di 5 000 mg/kg, in caso di esito A (decesso) si effettua il test su un secondo animale a 2 000 mg/kg; in caso di esito B o C (tossicità manifesta o nessun segno di tossicità) si può scegliere la dose di 5 000 mg/kg come dose iniziale per lo studio principale. Analogamente, se si utilizza una dose iniziale diversa da 5 000 mg/kg, in caso di esito B o C a 2 000 mg/kg si procede con la dose di 5 000 mg/kg; a tale dose, in caso di esito A si utilizza la dose di 2 000 mg/kg come dose iniziale per lo studio principale; in caso di esito B o C si utilizza la dose di 5 000 mg/kg

▼B

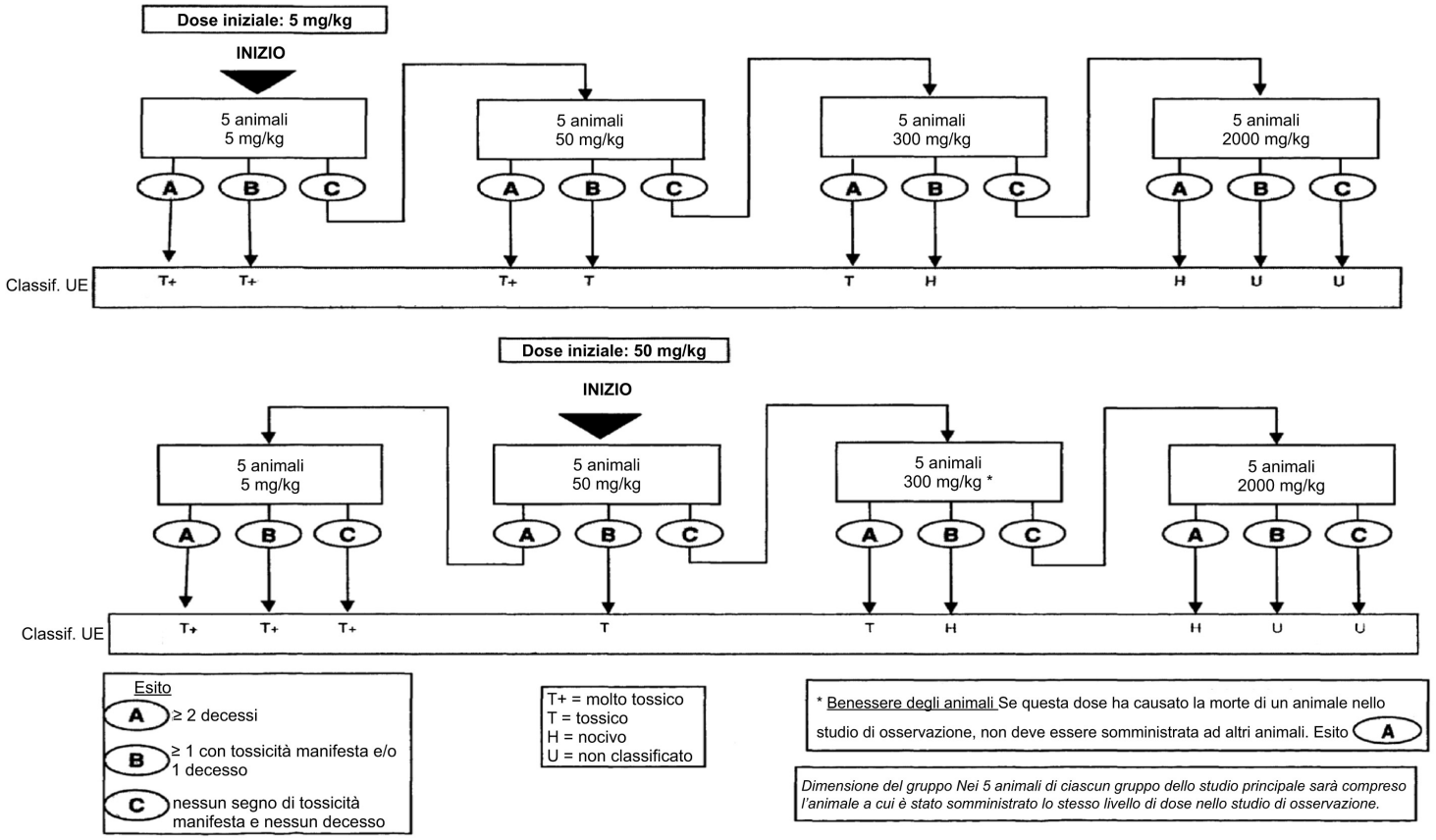
Studio principale

Ai criteri decisionali che regolano la procedura sequenziale di cui all'allegato 2 viene aggiunto un livello di dose di 5 000 mg/kg. Di conseguenza, quando nello studio principale si utilizza una dose iniziale di 5 000 mg/kg, in caso di esito A ($\geq$ 2 decessi) è necessario effettuare il test su un secondo gruppo a 2 000 mg/kg; in caso di esito B (tossicità evidente e/o $\leq$ 1 decesso) o C (nessun segno di tossicità) la sostanza non viene classificata nel sistema GHS. Analogamente, se si utilizza una dose iniziale diversa da 5 000 mg/kg, in caso di esito C a 2 000 mg/kg si procede con la dose di 5 000 mg/kg; a tale dose, in caso di esito A la sostanza è assegnata alla categoria 5 GHS, in caso di esito B o C la sostanza non è classificata.

Allegato 4

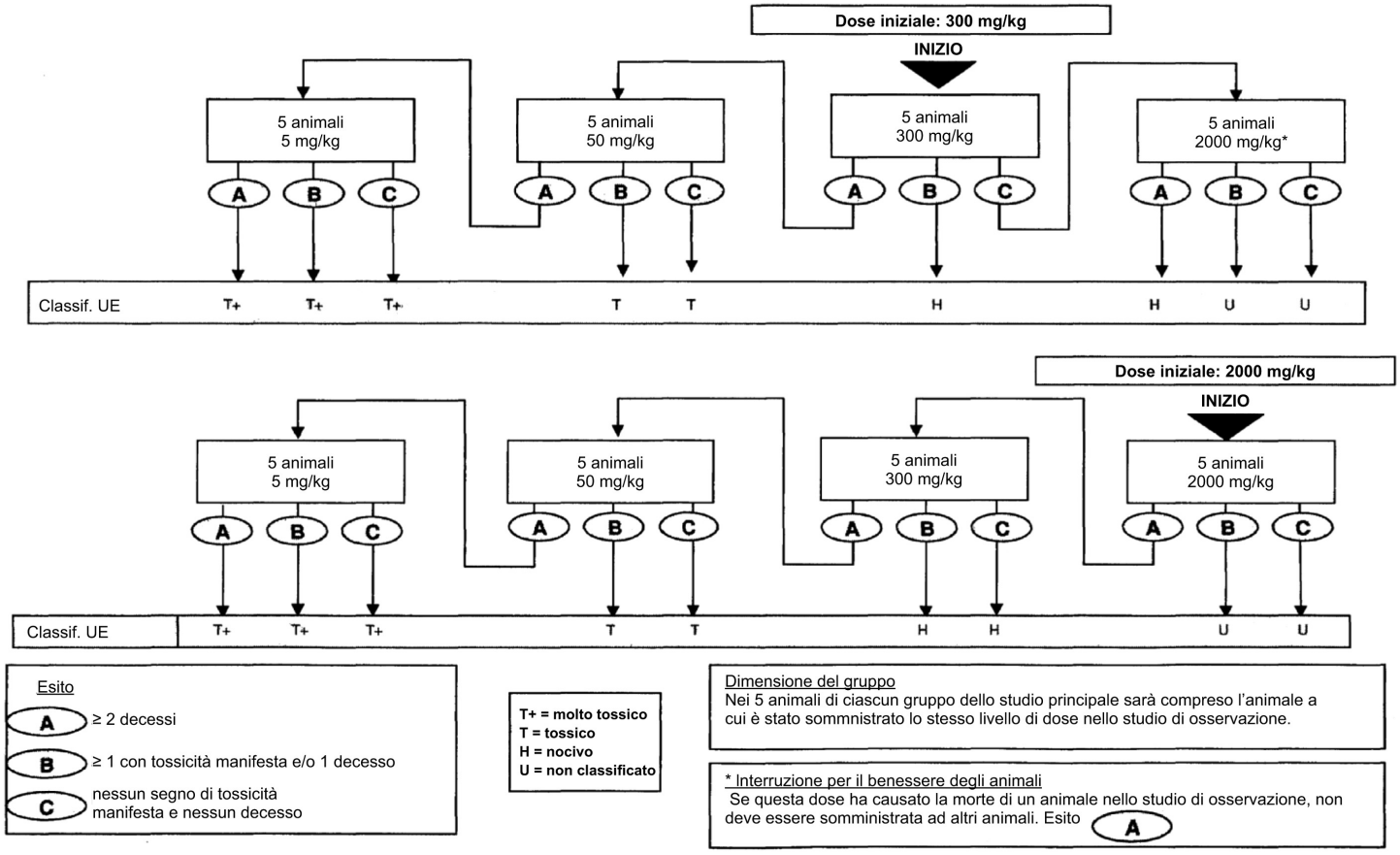
METODO DI PROVA B.1 *bis*

Guida alla classificazione transitoria UE in attesa dell'effettiva attuazione del sistema di classificazione armonizzato su scala mondiale (GHS) [cfr. riferimento bibliografico n. (8)]



02008R0440 — IT — 08.01.2026 — 011.001 — 162

▼B


Dose iniziale: 300 mg/kg
INIZIO
5 animali 5 mg/kg
5 animali 50 mg/kg
5 animali 300 mg/kg
5 animali 2000 mg/kg*
A B C
Classif. UE
T+ T+ T+ T T H H U U
Dose iniziale: 2000 mg/kg
INIZIO
5 animali 5 mg/kg
5 animali 50 mg/kg
5 animali 300 mg/kg
5 animali 2000 mg/kg
A B C
Classif. UE
T+ T+ T+ T T H H U U
Esito
A ≥ 2 decessi
B ≥ 1 con tossicità manifesta e/o 1 decesso
C nessun segno di tossicità manifesta e nessun decesso
T+ = molto tossico
T = tossico
H = nocivo
U = non classificato
Dimensione del gruppo
Nei 5 animali di ciascun gruppo dello studio principale sarà compreso l'animale a cui è stato somministrato lo stesso livello di dose nello studio di osservazione.
* Interruzione per il benessere degli animali
Se questa dose ha causato la morte di un animale nello studio di osservazione, non deve essere somministrata ad altri animali. Esito A

▼B

B.1*ter*. TOSSICITÀ ACUTA PER VIA ORALE — METODO DELLA CLASSE DI TOSSICITÀ ACUTA

1. METODO

Questo metodo di saggio è equivalente al metodo OCSE TG 423 (2001).

1.1 INTRODUZIONE

Il metodo della classe di tossicità acuta (1) qui descritto è un procedimento articolato in più fasi successive che prevede l'uso di 3 animali dello stesso sesso in ogni fase. In media, per valutare la tossicità acuta di una sostanza sono necessarie 2-4 fasi, in funzione del numero di animali morti e/o moribondi. Il procedimento è riproducibile, utilizza un numero molto limitato di animali e permette di classificare le sostanze in maniera analoga agli altri metodi di determinazione della tossicità acuta. Il metodo della classe di tossicità acuta si basa su valutazioni biometriche (2)(3)(4)(5) e utilizza dosi fisse, opportunamente separate, per consentire la classificazione della sostanza ai fini dell'assegnazione a una particolare categoria e della valutazione dei rischi. Il metodo, adottato nel 1996, è stato ampiamente convalidato *in vivo* mediante dati sulla DL_{50} ricavati dalla letteratura esistente, sia a livello nazionale (6) che a livello internazionale (7).

Per indicazioni sulla scelta del metodo di prova più adatto per scopi specifici, si rimanda al documento orientativo sui saggi di tossicità acuta per via orale dell'OCSE (8). Tale documento contiene anche ulteriori informazioni sull'applicazione e sull'interpretazione del metodo di saggio B.1 *ter*.

Non è necessario somministrare le sostanze da esaminare in dosi che provocano notoriamente dolore e sofferenze gravi per effetto delle proprietà corrosive o fortemente irritanti delle sostanze stesse. Ai fini dell'interpretazione dei risultati del saggio, gli animali moribondi o che manifestano segni evidenti di dolore o di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia e assimilati agli animali morti spontaneamente nel corso dell'esperimento. I criteri da applicare per decidere in merito al sacrificio degli animali moribondi o in stato di grave sofferenza sono oggetto di uno specifico documento orientativo, che riporta anche indicazioni su come riconoscere i segni di morte prevedibile o imminente (9).

Il metodo utilizza dosi prestabilite e i risultati che se ne ricavano permettono di classificare la sostanza esaminata conformemente al sistema armonizzato su scala mondiale (GHS) per la classificazione delle sostanze chimiche che causano tossicità acuta (10).

In linea di principio, il metodo non ha lo scopo di determinare una DL_{50} precisa, ma consente di stabilire range di esposizione verosimilmente letali: la morte di una certa percentuale di animali, infatti, costituisce ancora l'endpoint principale di questo saggio. Il metodo consente di determinare un valore di DL_{50} solo quando almeno due dosi provocano una mortalità superiore allo 0 % e inferiore al 100 %. L'uso di dosi prestabilite, indipendentemente dalla sostanza in esame, e la classificazione esplicitamente legata al numero di animali osservati in diversi stati favoriscono la congruenza e la ripetibilità dei dati presentati dai vari laboratori.

▼B

Il laboratorio che esegue il saggio deve consultare tutte le informazioni disponibili sulla sostanza in esame prima di effettuare lo studio. Tali informazioni devono riguardare quantomeno l'identità e la struttura chimica; le proprietà chimico-fisiche; i risultati di eventuali altri saggi di tossicità *in vitro* o *in vivo* eseguiti sulla sostanza; i dati tossicologici su sostanze di struttura affine; l'impiego o gli impieghi previsti. Queste informazioni sono necessarie per provare a tutti i soggetti interessati la rilevanza del saggio per la protezione della salute degli esseri umani, e sono utili per la scelta della dose iniziale più appropriata.

1.2 DEFINIZIONI

Tossicità acuta per via orale: effetti avversi che si verificano in seguito alla somministrazione orale di una singola dose di una sostanza o di più dosi nell'arco di 24 ore.

Morte tardiva: termine usato per indicare che l'animale non muore né appare moribondo nelle 48 ore successive alla somministrazione, ma muore successivamente nei 14 giorni del periodo di osservazione.

Dose: quantità di sostanza somministrata. Viene espressa in peso per unità di peso dell'animale usato per il saggio (p. es. mg/kg).

GHS: sistema armonizzato su scala mondiale per la classificazione delle sostanze chimiche e dei relativi miscugli. Si tratta di un'iniziativa congiunta dell'OCSE (salute degli esseri umani e ambiente), del Comitato di esperti delle Nazioni Unite sul trasporto delle sostanze pericolose (proprietà fisico-chimiche) e dell'ILO (comunicazione dei rischi), coordinata dal programma inter-organizzazioni per una gestione responsabile delle sostanze chimiche (IOMC).

Morte imminente: stato in cui si prevede che l'animale sarà moribondo o morto prima della successiva osservazione in programma. Nei roditori, tra i segni indicativi di morte imminente sono compresi convulsioni, posizione laterale o prona e tremore [per maggiori indicazioni, vedi il documento orientativo sugli endpoint non crudeli (9)].

DL_{50} (dose letale mediana): la singola dose di sostanza, determinata statisticamente, che si prevede causi la morte del 50 % degli animali a cui viene somministrata per via orale. Il valore della DL_{50} viene espresso in peso per unità di peso dell'animale usato per il saggio (mg/kg).

Dose limite: dose corrispondente al limite superiore fissato per il saggio (2 000 o 5 000 mg/kg).

Moribondo: che sta morendo o non è in grado di sopravvivere, nemmeno se sottoposto a trattamento [per maggiori indicazioni, vedi il documento orientativo sugli endpoint non crudeli (9)].

Morte prevedibile: presenza di segni clinici, ad esempio incapacità di raggiungere il cibo o l'acqua, che indicano che l'animale morirà prima della conclusione programmata dell'esperimento [per maggiori indicazioni, vedi il documento orientativo sugli endpoint non crudeli (9)].

▼B

1.3 PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

Il metodo prevede l'applicazione di un procedimento articolato in fasi successive che richiede l'uso di un numero minimo di animali in ciascuna fase e permette di ricavare informazioni sufficienti per la classificazione della tossicità acuta della sostanza in esame. La sostanza viene somministrata per via orale a un gruppo di animali da laboratorio in una delle dosi prestabilite. Il saggio viene effettuato seguendo un procedimento in fasi successive; in ciascuna fase vengono utilizzati tre animali dello stesso sesso (normalmente femmine). In funzione della presenza o assenza di mortalità riferibile alla sostanza in esame tra gli animali trattati, per ciascuna fase si possono avere tre esiti diversi:

— interruzione del saggio

— somministrazione della sostanza ad altri tre animali, alla stessa dose

— somministrazione della sostanza ad altri tre animali al livello di dose immediatamente superiore o inferiore.

Lo schema dettagliato del procedimento è riportato nell'allegato 1. Il metodo consente di valutare la sostanza allo scopo di assegnarla a una delle classi di tossicità definite da valori discriminanti fissi di DL_{50}.

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1 **Scelta delle specie di animali**

La specie di roditori da preferirsi è rappresentata dal ratto, ma è possibile utilizzare anche altre specie di roditori. Normalmente vengono utilizzati animali di sesso femminile (9), perché la letteratura esistente circa i saggi convenzionali sulla DL_{50} indica che, pur non essendovi grandi differenze di sensibilità tra i due sessi, nei casi in cui sono state osservate differenze in genere le femmine sono risultate leggermente più sensibili (11). Peraltro, se le informazioni disponibili sulle proprietà tossicologiche o tossicocinetiche di sostanze chimiche di struttura affine indicano che i maschi sono verosimilmente più sensibili delle femmine, si devono usare animali di sesso maschile. Qualora vengano usati animali di sesso maschile, se ne deve fornire un'adeguata motivazione.

Si devono utilizzare animali adulti giovani e sani appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. Ciascun animale, all'inizio del trattamento, deve essere di età compresa fra 8 e 12 settimane e di peso del ± 20 % del peso medio di eventuali animali a cui è stata precedentemente somministrata la sostanza in esame.

1.4.2 **Condizioni di stabulazione e di alimentazione**

La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve essere preferibilmente del 50-60 %; in ogni caso deve essere non inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale e alternare 12 ore di luce e 12 ore di oscurità. Per l'alimentazione si possono utilizzare diete convenzionali da laboratorio con acqua ad libitum. Nelle gabbie, gli animali possono essere raggruppati in funzione della dose, ma il numero di animali per gabbia non deve essere tale da impedire la corretta osservazione di ciascun esemplare.

▼B

1.4.3 **Preparazione degli animali**

Gli animali devono essere scelti in modo casuale, marchiati per consentire l'individuazione dei singoli esemplari e tenuti nelle gabbie per almeno 5 giorni prima dell'inizio del trattamento, in modo da consentirne l'acclimatazione alle condizioni di laboratorio.

1.4.4 **Preparazione delle dosi**

In genere le somministrazioni delle sostanze in esame devono avere un volume costante per tutte le dosi oggetto del saggio; a questo scopo, si varia la concentrazione del preparato da somministrare. Tuttavia, se il saggio viene eseguito su prodotti o miscugli che si presentano in forma liquida, ai fini della successiva valutazione del rischio può essere opportuno usare la sostanza non diluita, cioè a concentrazione costante; peraltro, l'uso della sostanza non diluita è prescritto da alcune autorità di regolamentazione. In ogni caso, non si deve superare il volume massimo somministrabile. Il volume massimo di liquido somministrabile in una sola volta dipende dalla taglia dell'animale. Nei roditori, di norma non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo tranne nel caso delle soluzioni acquose, per le quali si possono prevedere 2 ml/100 g di peso corporeo. Quanto alla formulazione del preparato da somministrare, si raccomanda di usare ove possibile una soluzione/sospensione/emulsione acquosa oppure, in ordine di preferenza, una soluzione/sospensione/emulsione in olio (per esempio olio di mais) o una soluzione in altri veicoli. Nel caso in cui si utilizzino veicoli diversi dall'acqua, devono essere note le caratteristiche di tossicità degli stessi. Le dosi devono essere preparate poco prima della somministrazione, tranne nel caso in cui la stabilità del preparato nell'arco del periodo di utilizzo sia nota e si sia dimostrata accettabile.

1.5 PROCEDIMENTO

1.5.1 **Somministrazione delle dosi**

La sostanza da saggiare viene somministrata in un'unica dose mediante sonda gastrica o idonea cannula per intubazione. Nel caso infrequente in cui non sia possibile somministrare l'intera quantità in un'unica dose, si può procedere al frazionamento della stessa e alla somministrazione delle varie frazioni nell'arco di un periodo non superiore a 24 ore.

Gli animali devono essere tenuti a digiuno prima della somministrazione della sostanza (p. es. l'alimentazione, a esclusione dell'acqua, deve essere sospesa a partire dalla sera precedente nei ratti e per 3-4 ore nei topi). Dopo il periodo di digiuno, si pesano gli animali e si somministra la sostanza da esaminare. A somministrazione avvenuta, il cibo può essere sospeso per altre 3-4 ore nei ratti o 1-2 ore nei topi. Qualora la dose venga frazionata e somministrata nell'arco di un certo periodo di tempo, può essere necessario alimentare e abbeverare gli animali in misura adeguata alla durata del periodo di somministrazione.

1.5.2 **Numero di animali e livelli di dose**

Si utilizzano tre animali in ciascuna fase. La dose iniziale viene scelta fra quattro livelli fissi: 5, 50, 300 e 2 000 mg/kg di peso corporeo. Il livello di dose iniziale deve essere quello che con maggior probabilità provoca la morte di una parte degli animali trattati. I diagrammi di flusso dell'allegato 1 illustrano il procedimento da seguire per ciascuna delle dosi iniziali, mentre l'allegato 4 riporta indicazioni sulla classificazione secondo il sistema UE in attesa dell'applicazione del nuovo sistema GHS.

▼B

Qualora, alla luce delle informazioni disponibili, la mortalità risulti improbabile al livello di dose iniziale più elevato (2 000 mg/kg di peso corporeo), si deve fare ricorso a un saggio limite. In mancanza di informazioni su una sostanza da esaminare, per il benessere degli animali si raccomanda di utilizzare la dose iniziale di 300 mg/kg di peso corporeo.

L'intervallo di tempo tra il trattamento dei diversi gruppi viene determinato in funzione dell'esordio, della durata e della gravità dei segni di tossicità, avendo cura di procedere al trattamento degli animali alla dose successiva solo una volta accertata la sopravvivenza degli animali trattati precedentemente.

In casi eccezionali, e solo se specifiche esigenze normative lo giustificano, può essere previsto un ulteriore livello di dose fisso superiore pari a 5 000 mg/kg (vedi allegato 2). Per il benessere degli animali, si sconsiglia di effettuare sperimentazioni su animali alle dosi stabilite per la categoria GHS 5 (2 000-5 000 mg/kg); l'utilizzo di tali dosi è da prevedere solo se vi è una probabilità elevata che i risultati del saggio abbiano rilevanza diretta per la tutela della salute degli animali o dell'uomo o per la salvaguardia dell'ambiente.

1.5.3 **Saggio limite**

Il saggio limite viene utilizzato principalmente quando lo sperimentatore dispone di informazioni che indicano che la sostanza in esame è verosimilmente non tossica, cioè causa tossicità solo in dosi superiori alle dosi limite previste per legge. Le informazioni sulla tossicità della sostanza in esame possono essere ricavate da conoscenze su composti, miscugli o prodotti simili esaminati, tenendo conto dell'identità e della percentuale dei componenti dei quali è nota la rilevanza tossicologica. Nel caso in cui le informazioni sulla tossicità della sostanza siano scarse o nulle, o in cui ci si attenda che la sostanza in esame sia tossica, il saggio principale deve essere eseguito.

Il saggio limite si effettua con un unico livello di dose di 2 000 mg/kg di peso corporeo su sei animali (tre animali per fase). In casi eccezionali, si può utilizzare un unico livello di dose di 5 000 mg/kg su tre animali (vedi allegato 2). Se si osservano decessi riferibili alla sostanza in esame, può essere necessario eseguire un altro saggio al livello di dose immediatamente inferiore.

1.6 OSSERVAZIONE

Dopo la somministrazione, gli animali sono esaminati individualmente almeno una volta nei primi 30 minuti, quindi periodicamente nelle prime 24 ore, ponendo particolare attenzione nelle prime 4 ore, e successivamente una volta al giorno per 14 giorni in tutto, tranne nel caso in cui sia necessario ritirarli dallo studio e sottoporli a eutanasia per motivi legati al loro benessere, o nel caso in cui vengano rinvenuti morti. Tuttavia, la durata dell'osservazione non è tassativa, e va stabilita in funzione delle reazioni tossiche, del momento della loro insorgenza e della durata del periodo di recupero; se necessario, quindi, è possibile prolungarla. Un parametro importante è rappresentato dal momento della comparsa e della scomparsa dei segni di tossicità, soprattutto se negli animali è rilevabile una tendenza a manifestare segni di tossicità tardiva (12). Tutte le osservazioni devono essere sistematicamente registrate su schede individuali per ogni animale.

▼B

Ulteriori osservazioni sono necessarie qualora gli animali presentino segni persistenti di tossicità. Dette osservazioni devono comprendere le modificazioni della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose, del sistema respiratorio e circolatorio, del sistema nervoso autonomo e centrale, dell'attività e del comportamento somatomotori. Particolare attenzione deve essere rivolta all'osservazione di tremori, convulsioni, salivazione, diarrea, letargia, sonno e coma. Si devono tenere in considerazione i principi e i criteri riassunti nel documento orientativo sugli endpoint non crudeli (9). Gli animali moribondi o che manifestano dolore intenso o segni di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia. Nel caso di animali sottoposti a eutanasia o rinvenuti morti, il momento del decesso deve essere registrato con la massima precisione possibile.

1.6.1 **Peso corporeo**

I singoli animali devono essere pesati poco prima della somministrazione della sostanza da saggiare e in seguito almeno una volta alla settimana. Le variazioni ponderali devono essere calcolate e registrate. Al termine del saggio, gli animali sopravvissuti devono essere pesati e sottoposti a eutanasia.

1.6.2 **Esame patologico**

Tutti gli animali utilizzati (compresi quelli che muoiono nel corso del saggio e quelli che sono ritirati dallo studio per motivi legati al loro benessere) devono essere sottoposti a necroscopia macroscopica. Per ogni animale devono essere registrate tutte le modificazioni patologiche di rilievo. Per gli animali sopravvissuti almeno 24 ore, l'esame microscopico degli organi recanti alterazioni patologiche evidenti potrebbe fornire indicazioni utili ed essere quindi opportuno.

2. **DATI**

Devono essere forniti dati individuali su ciascun animale. Inoltre, tutti i dati devono essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo del saggio, il numero di animali utilizzati, il numero di animali che hanno manifestato segni di tossicità, il numero di animali rinvenuti morti durante il saggio o sottoposti a eutanasia, il momento del decesso di ciascun animale, la descrizione degli effetti tossici con indicazioni sul decorso e sulla reversibilità, e i risultati della necroscopia.

3. **RELAZIONE**

3.1 **Relazione sul saggio**

La relazione sul saggio deve contenere le seguenti informazioni, a seconda dei casi:

Sostanza in esame:

— natura fisica, purezza e, se del caso, proprietà fisico-chimiche (compresa l'isomerizzazione);

— dati identificativi, compreso il numero CAS.

Veicolo (se del caso):

— motivazione della scelta del veicolo utilizzato, se diverso dall'acqua.

Animali da esperimento:

— specie/ceppo utilizzato;

▼B

— condizioni microbiologiche degli animali, qualora siano note;

— numero, età e sesso degli animali (compresa, se del caso, la motivazione dell'uso di esemplari maschi anziché femmine);

— provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.;

Condizioni sperimentali:

— informazioni dettagliate sulla formulazione della sostanza in esame, comprese informazioni sulla forma fisica del preparato somministrato;

— modalità precise di somministrazione della sostanza in esame, compresi volumi e orari delle somministrazioni;

— informazioni dettagliate sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo di dieta/provenienza, provenienza dell'acqua);

— motivazione della scelta della dose iniziale.

Risultati:

— tabella con risposta e livello di dose per ciascun animale (vale a dire animali che manifestano segni di tossicità, mortalità compresa; natura, gravità e durata degli effetti);

— tabella del peso corporeo e delle relative modificazioni;

— peso dei singoli animali il giorno della somministrazione, quindi a intervalli di una settimana, e infine al momento della morte o del sacrificio;

— data e ora della morte, se questa avviene prima del sacrificio programmato;

— momento della comparsa dei segni di tossicità, loro decorso ed eventuale reversibilità, per ciascun animale;

— reperti necroscopici ed eventuali reperti istopatologici per ciascun animale.

Discussione e interpretazione dei risultati.

Conclusioni.

4. **RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86

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

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

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

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

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method — An Alternative to the LD_{50} Test. Arch. Toxicol. 66,455-470.

▼B

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69,659-670.

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

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

(10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223-231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology.* Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

Allegato 1

PROCEDIMENTO DA SEGUIRE PER CIASCUNA DELLE DOSI INIZIALI

OSSERVAZIONI GENERALI

Il procedimento da seguire per ciascuna dose iniziale è indicato nei diagrammi di questo allegato.

— Allegato 1a: dose iniziale 5 mg/kg di peso corporeo

— Allegato 1b: dose iniziale 50 mg/kg di peso corporeo

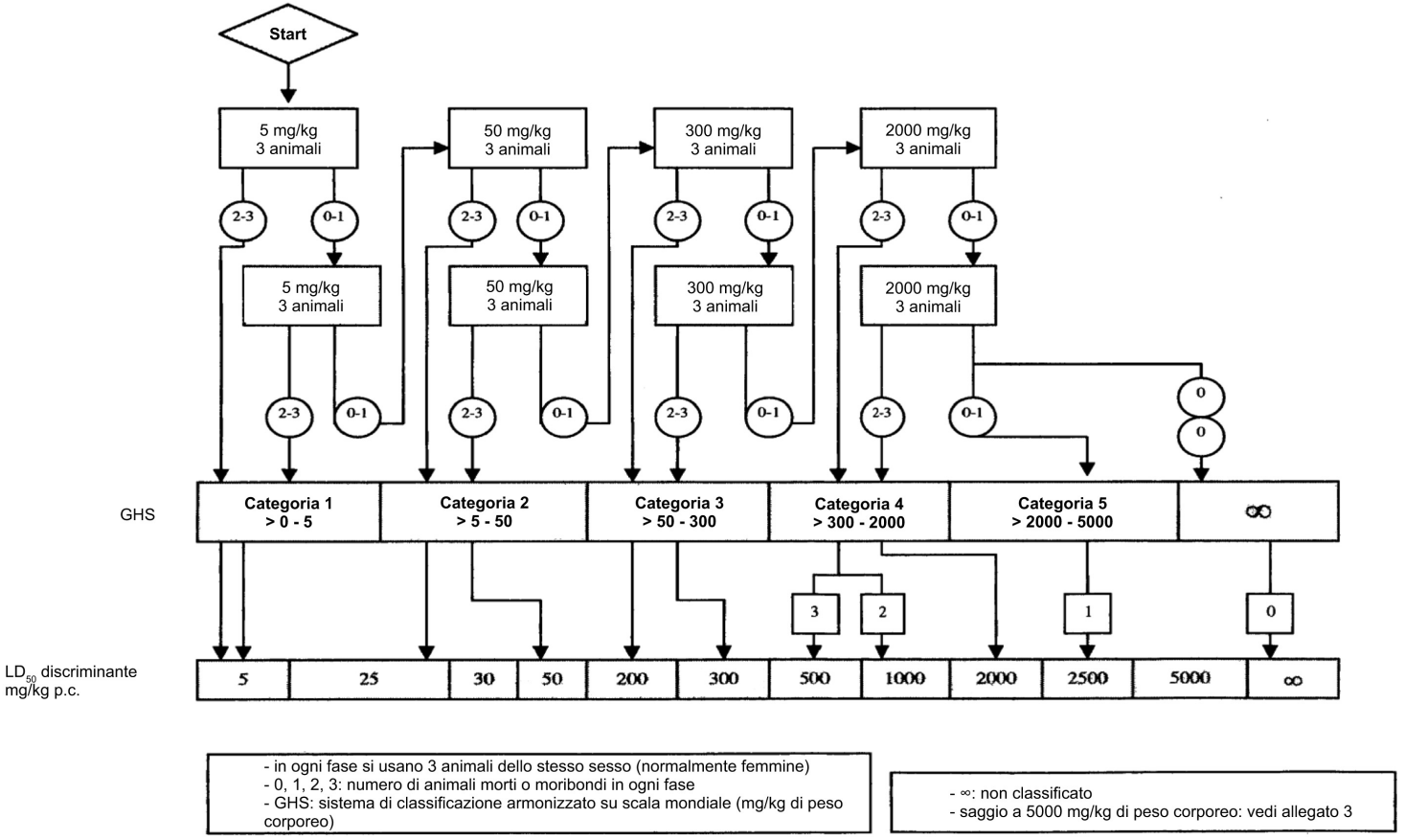
— Allegato 1c: dose iniziale 300 mg/kg di peso corporeo

— Allegato 1d: dose iniziale 2 000 mg/kg di peso corporeo

Il procedimento segue le frecce indicate, in funzione del numero di animali sottoposti a eutanasia o morti spontaneamente.

Allegato 1 A

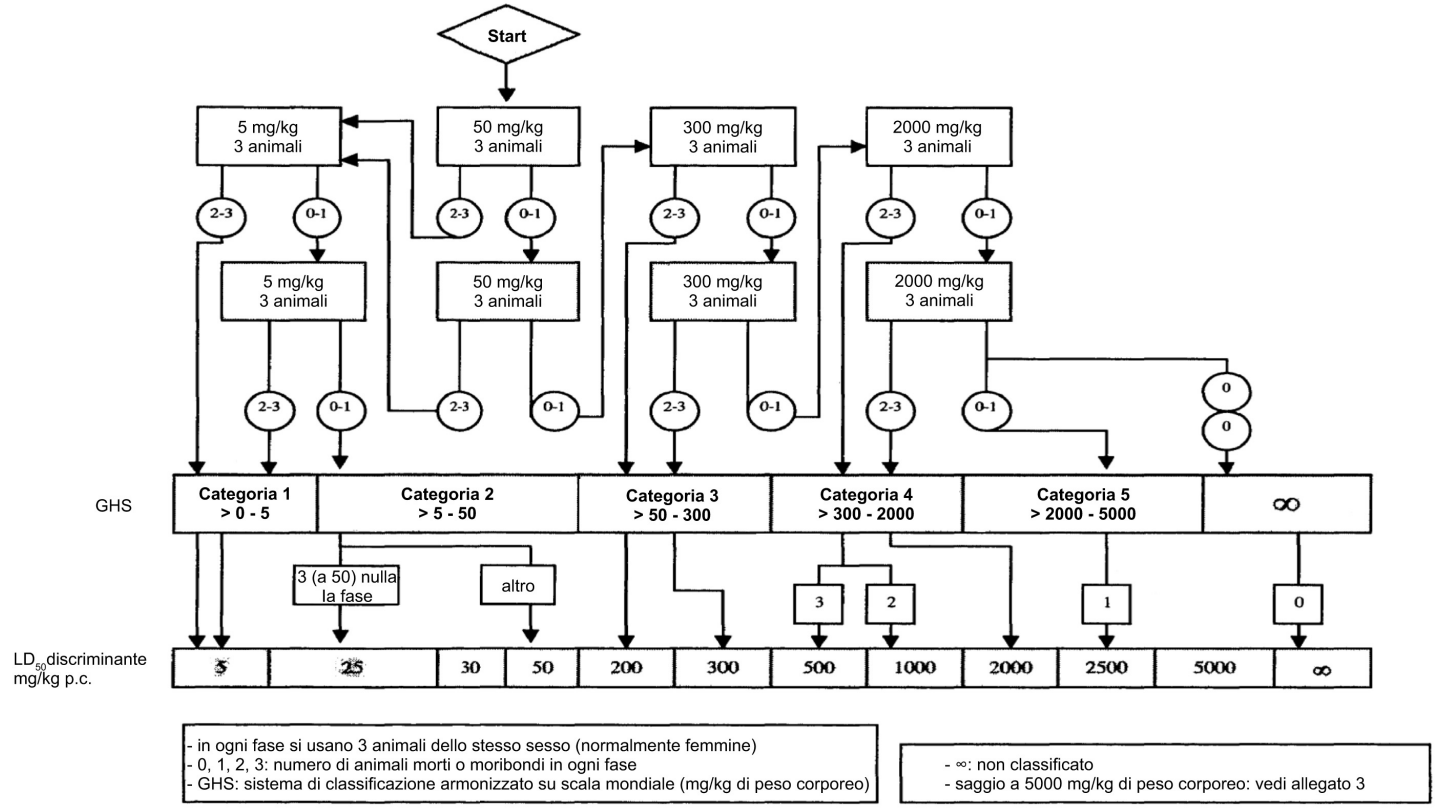
PROCEDIMENTO CON DOSE INIZIALE DI 5 MG/KG DI PESO CORPOREO



02008R0440 — IT — 08.01.2026 — 011.001 — 173

Allegato 1 B

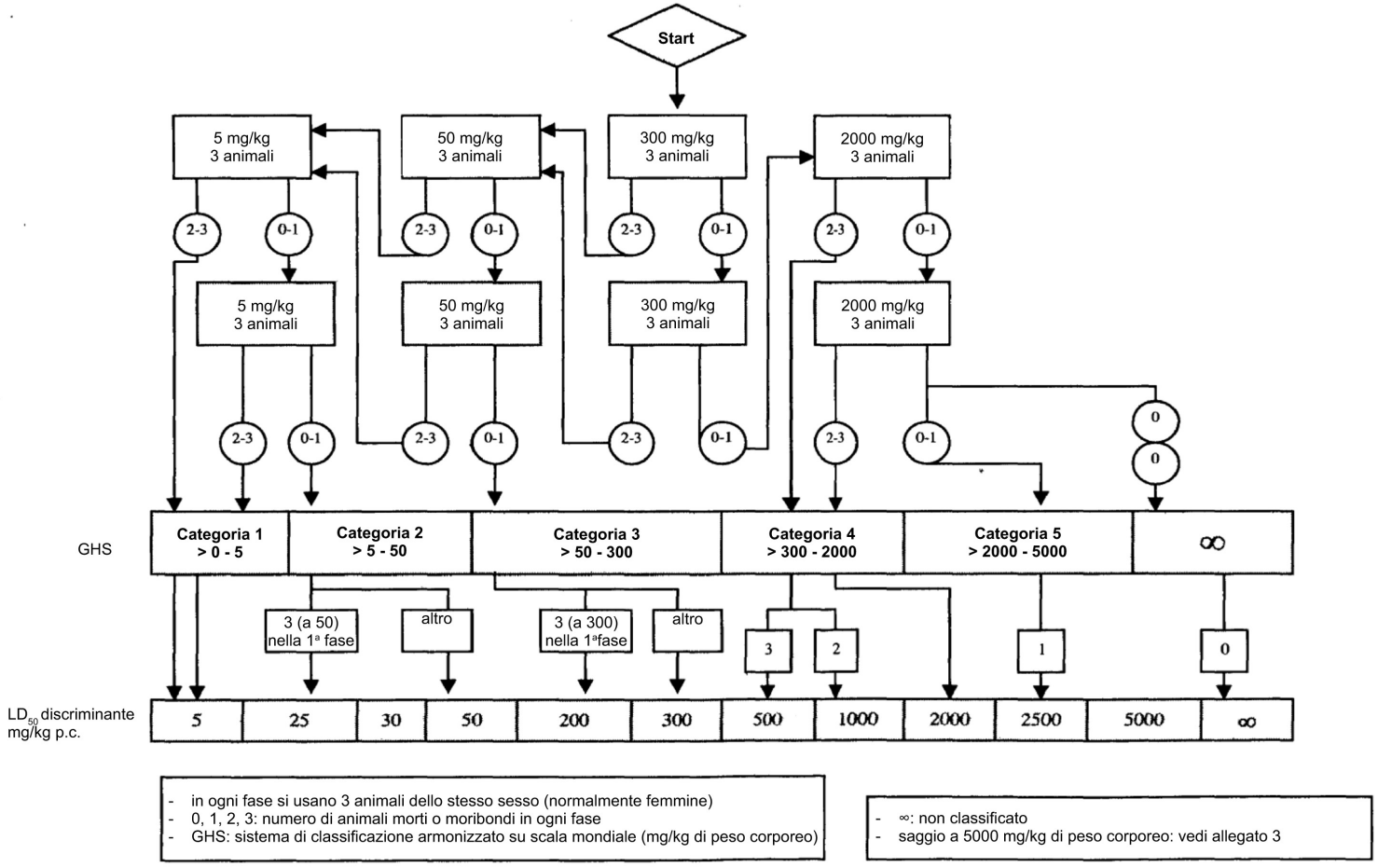
PROCEDIMENTO CON DOSE INIZIALE DI 50 MG/KG DI PESO CORPOREO



02008R0440 — IT — 08.01.2026 — 011.001 — 174

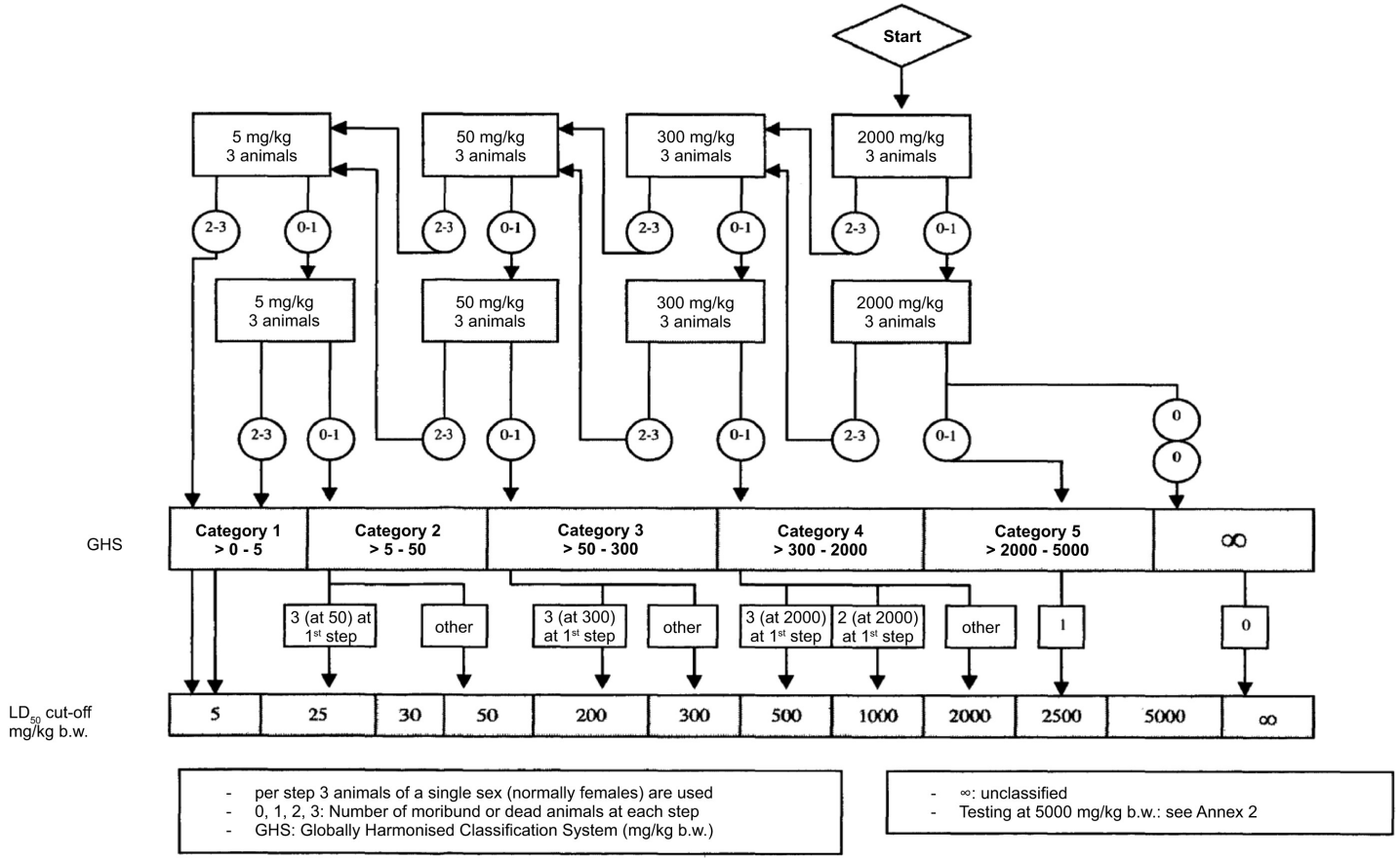
Allegato 1 C

PROCEDIMENTO CON DOSE INIZIALE DI 300 MG/KG DI PESO CORPOREO



Allegato 1 D

PROCEDIMENTO CON DOSE INIZIALE DI 2 000 MG/KG DI PESO CORPOREO



02008R0440 — IT — 08.01.2026 — 011.001 — 176

▼B

Allegato 2

CRITERI PER LA CLASSIFICAZIONE DI SOSTANZE CON VALORI DI DL_{50} ATTESI SUPERIORI A 2 000 MG/KG SENZA BISOGNO DI ESEGUIRE UN SAGGIO DI TOSSICITÀ

I criteri relativi alla categoria di rischio 5 hanno lo scopo di consentire l'identificazione di sostanze che presentano un rischio di tossicità acuta relativamente basso ma che, in determinate situazioni, possono rappresentare un pericolo per popolazioni vulnerabili. Si tratta di sostanze che si prevede abbiano una DL_{50} orale o cutanea compresa fra 2 000 e 5 000 mg/kg o dosi equivalenti per altre vie di somministrazione. Una sostanza può essere classificata nella categoria di rischio definita da: 2 000 mg/kg < DL_{50} < 5 000 mg/kg (categoria 5 nel GHS) nei casi seguenti:

a) se uno qualsiasi degli schemi di cui all'allegato 1a-1d porta a inserire tale sostanza in questa categoria, sulla base delle incidenze di mortalità;

b) se sono già disponibili dati obiettivi attendibili che indicano che la DL_{50} si situa nell'intervallo di valori della categoria 5, o se altri studi su animali o effetti tossici nell'uomo indicano un rischio di tossicità acuta per l'uomo;

c) per estrapolazione, stima o misurazione di dati se non è giustificata l'assegnazione a una classe di rischio maggiore, e se

   — sono disponibili informazioni attendibili che indicano effetti tossici significativi nell'uomo, o

   — si osserva mortalità nei saggi eseguiti fino ai valori della categoria 4 per via orale, o

   — valutazioni di esperti confermano segni clinici significativi di tossicità nei saggi eseguiti fino ai valori della categoria 4, a esclusione di diarrea, piloerezione o aspetto non tolettato, o

   — valutazioni di esperti confermano informazioni attendibili, ricavate dagli altri studi su animali, che indicano potenziali effetti acuti significativi.

ESECUZIONE DEL SAGGIO A DOSI SUPERIORI A 2 000 MG/KG

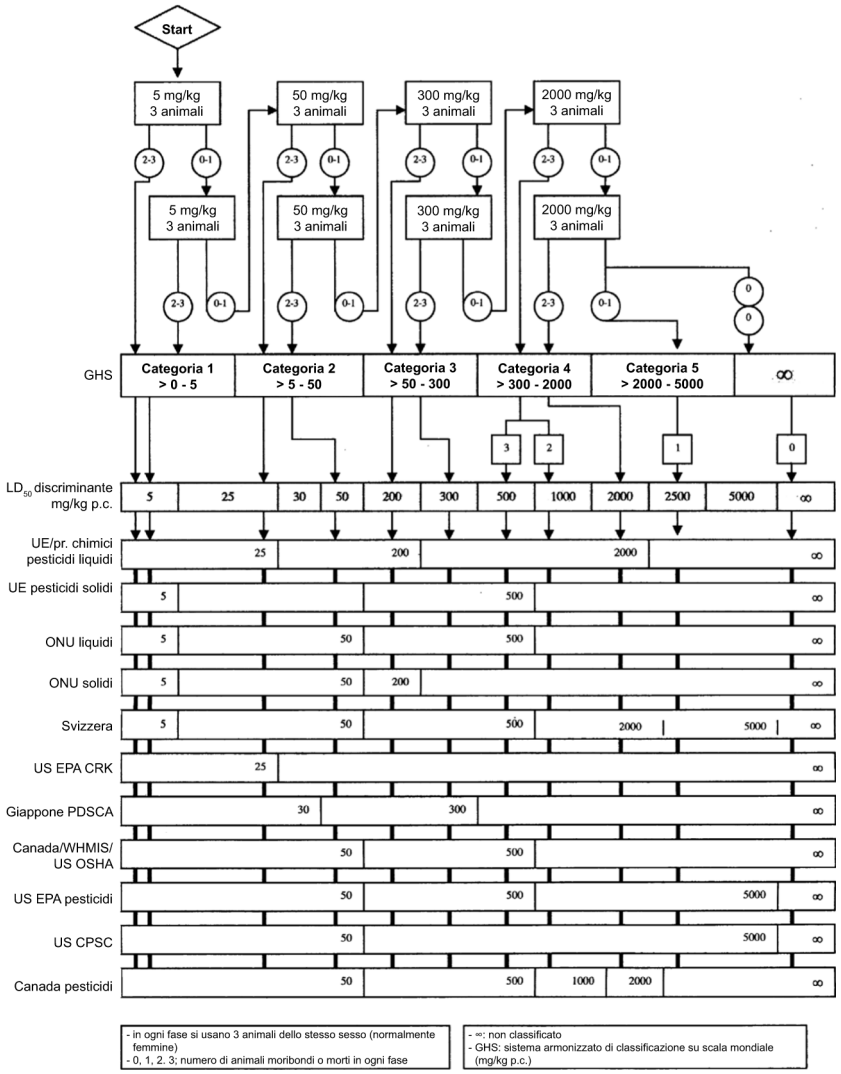
Data la necessità di tutelare il benessere degli animali, si sconsiglia di utilizzare la dose prevista per la categoria 5 (5 000 mg/kg); l'utilizzo di tale dose è da prevedere solo nel caso in cui sia molto probabile che i risultati del saggio abbiano rilevanza diretta per la protezione della salute degli esseri umani o degli animali (10). Non devono essere effettuati ulteriori saggi a livelli di dose superiori.

Quando è necessario effettuare un saggio di tossicità alla dose di 5 000 mg/kg, tale saggio deve essere eseguito in una sola fase (e quindi su tre animali). Se il primo animale a cui viene somministrata la sostanza muore, si procede somministrando la sostanza a 2 000 mg/kg, così come indicato nei diagrammi di flusso dell'allegato 1. Se il primo animale sopravvive, la sostanza viene somministrata alla stessa dose ad altri due animali. Se solo uno dei tre animali muore, si ritiene che il valore di DL_{50} sia superiore a 5 000 mg/kg. Se due animali muoiono, si procede somministrando la sostanza a 2 000 mg/kg.

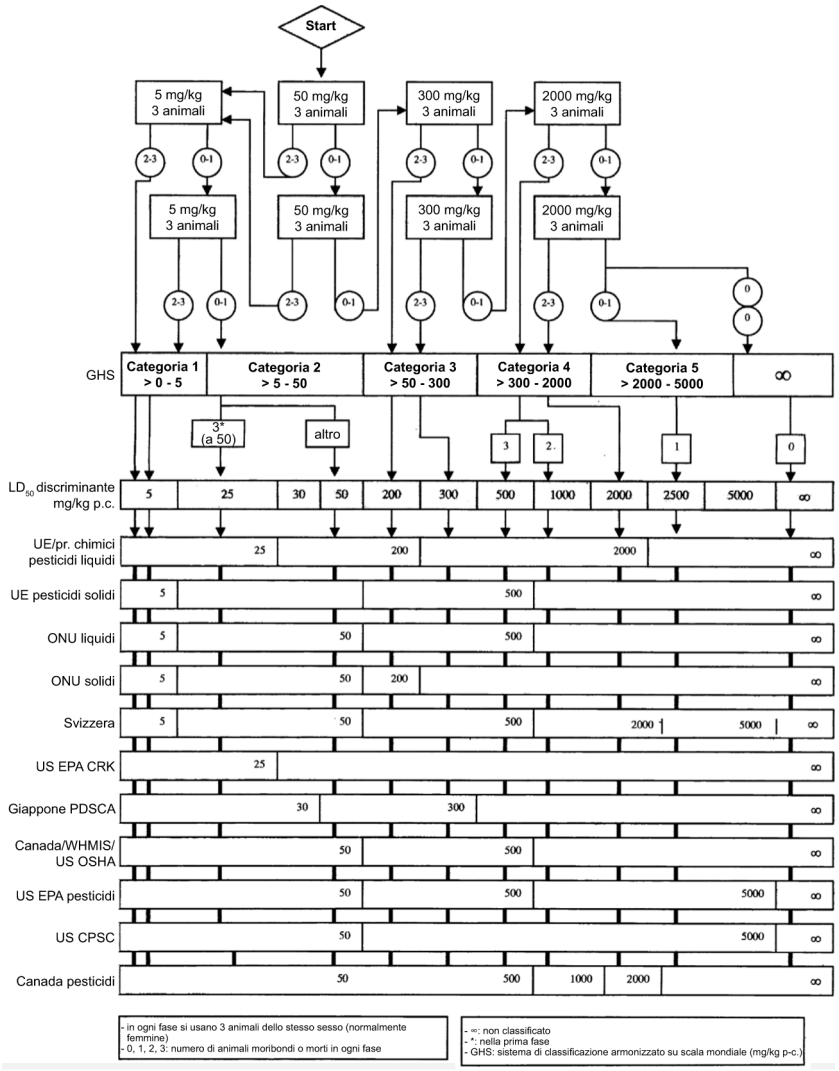
▼B

Allegato 3

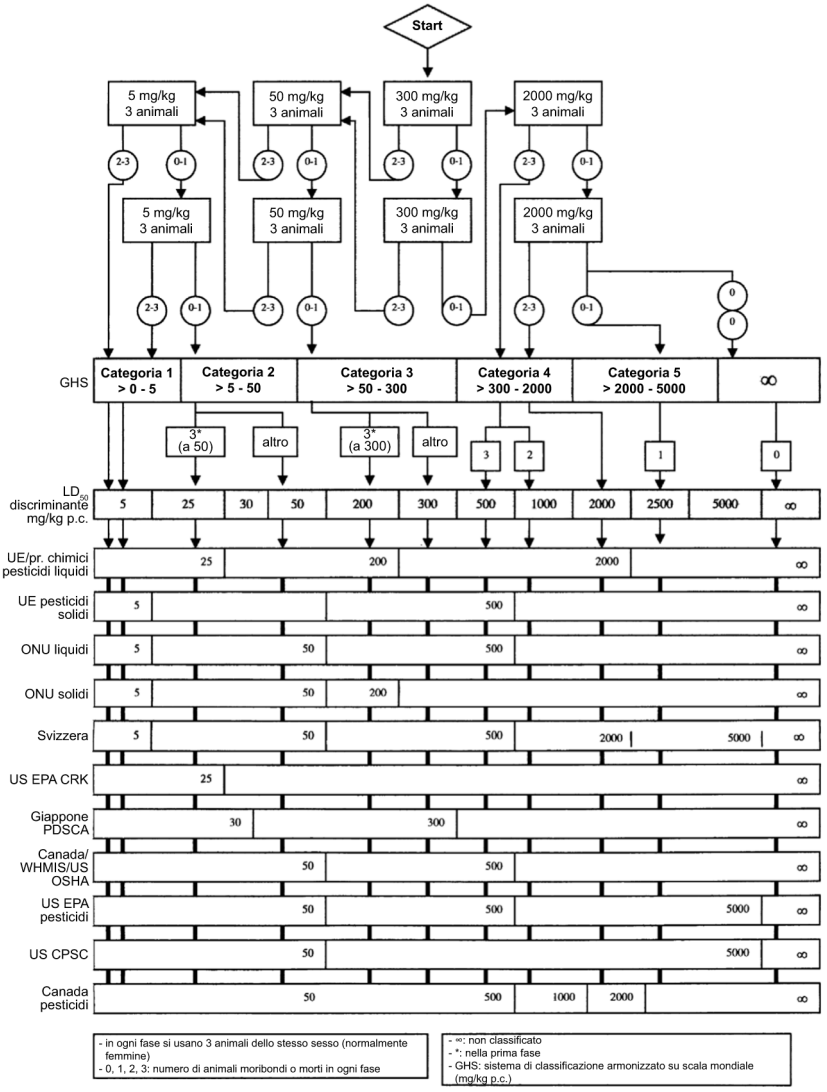
METODO DI SAGGIO B.1 *ter*: indicazioni sulla classificazione secondo lo schema UE nel periodo di transizione in attesa della piena applicazione del sistema di classificazione armonizzato su scala mondiale (GHS) [ricavate dalla voce bibliografica (8)]



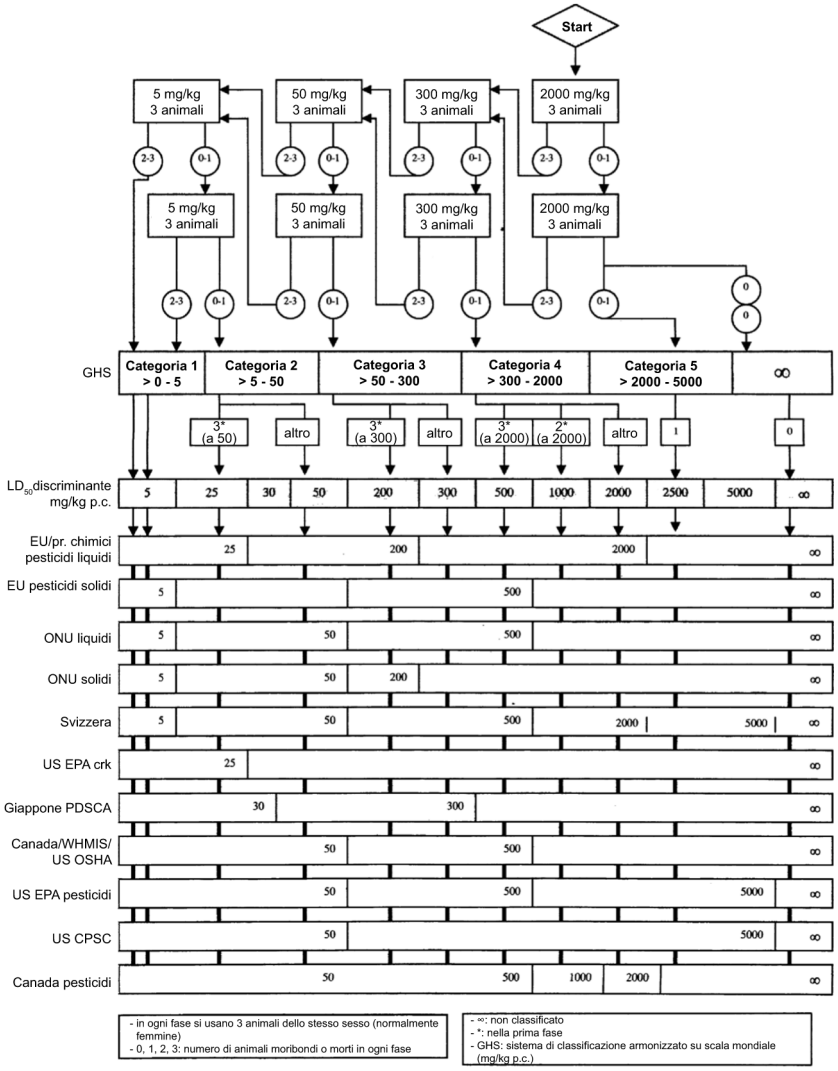
▼B


Start
5 mg/kg 3 animali
50 mg/kg 3 animali
300 mg/kg 3 animali
2000 mg/kg 3 animali
2-3
0-1
0
GHS
Categoria 1 > 0 - 5
Categoria 2 > 5 - 50
Categoria 3 > 50 - 300
Categoria 4 > 300 - 2000
Categoria 5 > 2000 - 5000
∞
3* (a 50)
altro
3
2
1
0
LD50 discriminante mg/kg p.c.
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
UE/pr. chimici pesticidi liquidi
UE pesticidi solidi
ONU liquidi
ONU solidi
Svizzera
US EPA CRK
Giappone PDSCA
Canada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticidi
US CPSC
Canada pesticidi
- in ogni fase si usano 3 animali dello stesso sesso (normalmente femmine)
- 0, 1, 2, 3: numero di animali moribondi o morti in ogni fase
- ∞: non classificato
- *: nella prima fase
- GHS: sistema di classificazione armonizzato su scala mondiale (mg/kg p-c.)

▼B


Start
5 mg/kg 3 animali
50 mg/kg 3 animali
300 mg/kg 3 animali
2000 mg/kg 3 animali
2-3
0-1
0
GHS
Categoria 1 > 0 - 5
Categoria 2 > 5 - 50
Categoria 3 > 50 - 300
Categoria 4 > 300 - 2000
Categoria 5 > 2000 - 5000
∞
3* (a 50)
altro
3* (a 300)
altro
3
2
1
0
LD50 discriminante mg/kg p.c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
UE/pr. chimici pesticidi liquidi
UE pesticidi solidi
ONU liquidi
ONU solidi
Svizzera
US EPA CRK
Giappone PDSCA
Canada/ WHMIS/US OSHA
US EPA pesticidi
US CPSC
Canada pesticidi
- in ogni fase si usano 3 animali dello stesso sesso (normalmente femmine)
- 0, 1, 2, 3: numero di animali moribondi o morti in ogni fase
- ∞: non classificato
- *: nella prima fase
- GHS: sistema di classificazione armonizzato su scala mondiale (mg/kg p.c.)

▼B


Start
5 mg/kg 3 animali
50 mg/kg 3 animali
300 mg/kg 3 animali
2000 mg/kg 3 animali
2-3
0-1
0
GHS
Categoria 1 > 0 - 5
Categoria 2 > 5 - 50
Categoria 3 > 50 - 300
Categoria 4 > 300 - 2000
Categoria 5 > 2000 - 5000
∞
3* (a 50)
altro
3* (a 300)
3* (a 2000)
2* (a 2000)
1
LD50 discriminante mg/kg p.c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU/pr. chimici pesticidi liquidi
EU pesticidi solidi
ONU liquidi
ONU solidi
Svizzera
US EPA crk
Giappone PDSCA
Canada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticidi
US CPSC
Canada pesticidi
- in ogni fase si usano 3 animali dello stesso sesso (normalmente femmine)
- 0, 1, 2, 3: numero di animali moribondi o morti in ogni fase
- ∞: non classificato
- *: nella prima fase
- GHS: sistema di classificazione armonizzato su scala mondiale (mg/kg p.c.)

▼**M4**

B.2. **TOSSICITÀ ACUTA PER INALAZIONE**

▼**M11**

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼B

B.3. TOSSICITÀ ACUTA PER VIA CUTANEA

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼M8

B.4 IRRITAZIONE/CORROSIONE CUTANEA ACUTA

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 404 (2015). Le linee guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche sono rivedute periodicamente affinché riflettano le migliori conoscenze scientifiche disponibili. Nella revisione della linea guida dell'OCSE n. 404 è stata dedicata particolare attenzione ai miglioramenti possibili in relazione al benessere degli animali e alla valutazione di tutte le informazioni disponibili sulla sostanza chimica in esame, per evitare prove non necessarie sugli animali da laboratorio. La versione aggiornata della linea guida dell'OCSE n. 404 (originariamente adottata nel 1981 e riveduta nel 1992, nel 2002 e nel 2015) contiene un riferimento al documento di orientamento IATA (*Integrated Approaches to Testing and Assessment,* approcci integrati in materia di prove e valutazioni) per l'irritazione/corrosione cutanea (1), che propone un approccio modulare a tali prove. Oltre a descrivere vari moduli che raggruppano fonti d'informazioni e strumenti di analisi, il documento IATA i) fornisce orientamenti su come integrare e utilizzare i dati esistenti, sperimentali e non, a fini di valutazione del potenziale irritante e corrosivo delle sostanze chimiche a livello cutaneo, e ii) propone un approccio per i casi in cui sono necessarie prove aggiuntive (1). Nella prova iniziale *in vivo* la linea guida raccomanda inoltre, ove opportuno, di applicare all'animale le tre compresse per la prova da contatto una dopo l'altra anziché simultaneamente.

2. Le definizioni di irritazione e corrosione cutanea figurano nell'appendice del presente metodo di prova.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

3. Nell'interesse sia dell'accuratezza scientifica sia del benessere degli animali, è opportuno non ricorrere alle prove *in vivo* finché tutti i dati pertinenti disponibili circa il potenziale di corrosività/irritazione cutanea della sostanza chimica in esame non siano stati valutati nell'ambito di un'analisi basata sul "peso dell'evidenza", descritta nel documento di orientamento IATA per la corrosione e l'irritazione cutanea (vale a dire secondo quanto illustrato nelle tre parti del documento e nei relativi moduli) (1). In sintesi, nella parte 1 si prendono in considerazione i dati esistenti, suddivisi in sette moduli riguardanti i dati umani, i dati *in vivo*, i dati *in vitro*, i dati sulle proprietà fisico-chimiche (ad esempio il pH, in particolare una forte acidità o una forte alcalinità) e i metodi non sperimentali. Nella parte 2 si esegue l'analisi basata sul peso dell'evidenza. Se non è conclusiva si procede alle prove supplementari di cui alla parte 3, dapprima con metodi *in vitro* e soltanto come ultima istanza facendo ricorso a prove *in vivo*. Tale analisi dovrebbe pertanto portare a ridurre la necessità di prove *in vivo* relative alla corrosione/irritazione cutanea causata dalle sostanze chimiche per le quali, in relazione a questi due endpoint, altri studi hanno già fornito evidenza sufficiente.

PRINCIPIO DELLA PROVA IN VIVO

4. La sostanza chimica in esame è applicata in un'unica dose sulla pelle dell'animale sperimentale; le zone di pelle non trattate servono da controllo. A intervalli specificati si osserva il grado di irritazione/corrosione, che viene annotato sulla base di una scala di valori; esso viene inoltre descritto in modo dettagliato per fornire una valutazione completa degli effetti. La durata dello studio deve essere sufficiente a valutare la reversibilità o irreversibilità degli effetti osservati.

▼M8

5. Gli animali che, in qualsiasi fase della prova, manifestano segni prolungati di grave sofferenza e/o dolore vanno soppressi con metodi non cruenti e la sostanza chimica in esame va valutata di conseguenza. I criteri da seguire nel decidere la soppressione con metodi non cruenti di animali moribondi o molto sofferenti formano l'oggetto di uno specifico documento di orientamento (2).

PREPARAZIONE PER LA PROVA IN VIVO

Selezione della specie animale

6. L'animale sperimentale di elezione è il coniglio albino; vanno utilizzati giovani adulti sani. L'eventuale ricorso ad altre specie animali deve essere giustificato.

Preparazione degli animali

7. All'incirca 24 ore prima della prova occorre rasare il pelo nella zona dorsale del tronco degli animali evitando di scorticare la pelle. Usare solo animali la cui pelle è sana e intatta.

8. Alcuni ceppi di coniglio presentano zone di pelo denso che sono più evidenti in alcuni periodi dell'anno. Tali aree di crescita densa del pelo non vanno usate ai fini della prova.

Condizioni di stabulazione e alimentazione

9. Gli animali vanno posti in gabbie individuali. La temperatura del locale deve essere di 20 °C (± 3 °C) per i conigli. L'umidità relativa deve essere preferibilmente del 50-60 %; in ogni caso deve raggiungere almeno il 30 % e possibilmente non superare il 70 %, tranne durante la pulizia degli ambienti. L'illuminazione deve essere artificiale, alternando 12 ore di luce e 12 ore di buio. Per l'alimentazione, i conigli saranno sottoposti a una dieta convenzionale da laboratorio e disporranno di acqua potabile a volontà.

PROCEDURA SPERIMENTALE

Applicazione della sostanza chimica in esame

10. La sostanza chimica in esame va applicata su una zona ridotta (circa 6 cm^2) di pelle e coperta con una compressa di garza fissata con un cerotto non irritante. Nei casi in cui non è possibile l'applicazione diretta (ad es. liquidi o alcune paste), la sostanza chimica in esame va prima applicata sulla compressa di garza, che poi è a sua volta applicata sulla pelle. La compressa va mantenuta in contatto lasco con la pelle mediante un'apposita fasciatura semiocclusiva per tutto il periodo di esposizione. Se la sostanza chimica in esame è applicata sulla compressa, quest'ultima va posizionata in modo che detta sostanza entri correttamente a contatto con la pelle e sia distribuita uniformemente. Occorre impedire che l'animale abbia accesso alla compressa e ingerisca o inali la sostanza chimica in esame.

11. Le sostanze chimiche liquide sono generalmente testate allo stato non diluito. Per l'esame dei solidi (che possono essere ridotti in polvere, se ritenuto necessario) la sostanza chimica in esame va inumidita con la minor quantità d'acqua (o, se del caso, di un altro mezzo disperdente adeguato) sufficiente ad assicurare un buon contatto con la pelle. Se si impiegano mezzi disperdenti diversi dall'acqua, la potenziale influenza del mezzo disperdente sull'irritazione cutanea causata dalla sostanza chimica in esame deve essere minima o nulla.

12. Al termine del periodo di esposizione, che è normalmente di quattro ore, la sostanza chimica in esame residua va rimossa usando, ove possibile, acqua o un solvente adeguato, senza alterare la risposta da essa provocata o l'integrità dell'epidermide.

▼M8

Livelli di dose

13. Sul punto prescelto per la prova va applicata una dose di 0,5 ml di liquido o 0,5 g di solido o pasta.

Prova iniziale (prova di irritazione/corrosione cutanea in vivo su un solo animale)

14. Se la sostanza chimica in esame è stata giudicata corrosiva, irritante o non classificata sulla base di un'analisi basata sul peso dell'evidenza o di precedenti prove *in vitro*, ulteriori prove *in vivo* sono generalmente superflue. Tuttavia, nei casi in cui si ritiene necessario ottenere dati aggiuntivi, la prova *in vivo* viene eseguita inizialmente usando un solo animale e applicando il metodo seguente: applicare in sequenza all'animale al massimo tre compresse per la prova da contatto. Togliere la prima compressa dopo tre minuti. Se non si osservano reazioni cutanee gravi, applicare una seconda compressa in un punto differente e rimuoverla dopo un'ora. Se le osservazioni in questa fase indicano che è possibile prolungare l'esposizione fino a quattro ore senza causare sofferenze, applicare una terza compressa, che è rimossa dopo quattro ore, e classificare la reazione.

15. Se dopo una qualsiasi delle tre esposizioni in sequenza si osserva un effetto corrosivo, interrompere immediatamente la prova. Se dopo la rimozione dell'ultima compressa non si osserva alcun effetto corrosivo, mantenere l'animale sotto osservazione per quattordici giorni, a meno che la corrosione non si manifesti prima.

16. Qualora si preveda che la sostanza chimica in esame possa risultare irritante, ma non che produca corrosione, applicare un'unica compressa a un solo animale per quattro ore.

Prova confirmatoria (prova di irritazione cutanea in vivo su ulteriori animali)

17. Se nella prova iniziale non si osservano effetti corrosivi, confermare la reazione irritante o negativa su altri due animali al massimo, applicando a ciascuno una compressa per un periodo di esposizione di quattro ore. Se nella prova iniziale si osserva un effetto irritante, la prova confirmatoria può essere condotta in maniera sequenziale, oppure mediante esposizione simultanea di due ulteriori animali. Nel caso eccezionale in cui non sia stata eseguita la prova iniziale, due o tre animali possono essere trattati applicando una sola compressa, che va rimossa dopo quattro ore. Se si usano due animali ed entrambi evidenziano la stessa reazione, non sono necessarie ulteriori prove. In caso contrario si sottopone alla prova anche il terzo animale. È possibile che siano necessari altri animali per valutare le reazioni dubbie.

Periodo di osservazione

18. La durata del periodo di osservazione deve essere sufficiente a valutare completamente la reversibilità degli effetti osservati. Occorre tuttavia interrompere l'esperimento se, in qualsiasi momento, l'animale mostra segni continui di grave dolore o sofferenza. Per determinare la reversibilità degli effetti gli animali vanno osservati per 14 giorni dopo la rimozione delle compresse. Se la reversibilità si manifesta prima del quattordicesimo giorno, interrompere subito l'esperimento.

Osservazioni cliniche e classificazione delle reazioni cutanee

19. Esaminare tutti gli animali per verificare se presentano segni di eritema o di edema e classificare le reazioni a 60 minuti e successivamente a 24, 48 e 72 ore dalla rimozione della compressa. Per la prova iniziale su un solo animale, esaminare la zona prescelta per la prova subito dopo la rimozione della compressa. Le reazioni cutanee sono classificate e registrate in base ai gradi indicati nella tabella riportata più avanti. Se la pelle presenta una lesione che non può essere identificata come irritazione o corrosione a 72 ore, può essere necessario proseguire l'osservazione fino al giorno 14 per determinare la

▼M8

reversibilità degli effetti. In aggiunta all'osservazione delle irritazioni, descrivere e documentare tutti gli effetti tossici locali, come la perdita del grasso cutaneo, ed eventuali effetti sistemici negativi (ad es. effetti sui segni clinici di tossicità e sul peso corporeo). Per chiarire le reazioni dubbie, valutare l'opportunità di eseguire un esame istopatologico.

20. La classificazione delle reazioni cutanee è necessariamente soggettiva. Per favorirne l'armonizzazione e per assistere i laboratori e le persone che eseguono la prova e interpretano le osservazioni, istruire adeguatamente il personale sul sistema di punteggio usato (cfr. tabella più avanti). Potrebbe essere utile una guida illustrata per la classificazione dell'irritazione cutanea e di altre lesioni (3).

DATI E RELAZIONE

21. I risultati dello studio vanno riassunti sotto forma di tabella nella relazione finale sulla prova e devono comprendere tutti gli elementi elencati al paragrafo 24.

Valutazione dei risultati

22. Valutare il grado di irritazione cutanea congiuntamente alla natura e alla gravità delle lesioni, nonché alla loro reversibilità o irreversibilità. I punteggi individuali non forniscono un valore assoluto delle proprietà irritanti di un materiale, in quanto vanno valutatati anche altri effetti del materiale in esame. Per contro, essi devono essere considerati come valori di riferimento che vanno valutati congiuntamente a tutte le altre osservazioni emerse dallo studio.

23. Nella valutazione delle reazioni irritanti è necessario considerare la reversibilità delle lesioni cutanee. Quando reazioni quali alopecia (zona limitata), ipercheratosi, iperplasia e desquamazione persistono fino alla fine del periodo di osservazione di 14 giorni, la sostanza chimica in esame va considerata irritante.

Relazione sull'esecuzione della prova

24. La relazione sull'esecuzione della prova deve comprendere le informazioni elencate di seguito.

Giustificazione della prova in vivo:

— Analisi basata sul peso dell'evidenza dei risultati ottenuti da prove precedenti, compresi i risultati della strategia di prova sequenziale;

— descrizione dei dati pertinenti disponibili da prove precedenti;

— dati ricavati in ciascuna fase della strategia di prova;

— descrizione delle prove *in vitro* eseguite, inclusi i dettagli delle procedure e i risultati ottenuti per le sostanze in esame/di riferimento;

— analisi basata sul peso dell'evidenza per l'esecuzione dello studio *in vivo*.

Sostanza chimica in esame:

— sostanza monocostituente: identificazione della sostanza chimica, ad esempio mediante denominazione IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale, identità chimica delle impurità (se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono), ecc.;

▼M8

— sostanza multicostituente, miscela e sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici (UVCB): caratterizzati per quanto possibile mediante l'identità chimica (cfr. sopra), la presenza quantitativa e le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti;

— aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche pertinenti;

— fonte, numero del lotto se disponibile;

— trattamento della sostanza chimica in esame/sostanza di controllo prima della prova, se del caso (ad es. riscaldamento, frantumazione);

— stabilità della sostanza chimica in esame, data limite di utilizzo o data della nuova analisi, se nota;

— condizioni di conservazione.

Mezzo disperdente:

— identificazione, concentrazione (ove pertinente), volume usato;

— motivazione della scelta del mezzo disperdente.

Animale/i sperimentale/i:

— specie/ceppo usato, motivazione dell'uso di animali diversi dal coniglio albino;

— numero di animali di ciascun sesso;

— peso di ciascun animale all'inizio e alla conclusione della prova;

— età all'inizio dello studio;

— origine degli animali, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.

Condizioni sperimentali:

— tecnica di preparazione dell'area di applicazione della compressa;

— dettagli relativi ai materiali utilizzati e alla tecnica di preparazione e di applicazione della compressa;

— dettagli relativi a preparazione, applicazione e rimozione della sostanza chimica in esame.

Risultati:

— tabella con i punteggi assegnati alle reazioni irritanti/corrosive per ciascun animale in tutti i momenti di misurazione;

— descrizione di tutte le lesioni osservate;

— descrizione circostanziata della natura e del grado dell'irritazione o della corrosione osservata e di eventuali reperti istopatologici;

— descrizione di altri effetti negativi locali (ad es. perdita del grasso cutaneo) e sistemici oltre all'irritazione o alla corrosione cutanea.

▼**M8**

Discussione dei risultati

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 19), Organistion for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Tabella

Classificazione Delle Reazioni Cutanee

Eritema e formazione di escara

Nessun eritema…	0
Eritema molto lieve (appena percettibile)…	1
Eritema ben definito…	2
Eritema da moderato a grave…	3
Eritema grave (rosso vivo) fino alla formazione di escara che impedisce la classificazione dell'eritema…	4

Massimo possibile: 4

Formazione di edema

Nessun edema…	0
Edema molto lieve (appena percettibile)…	1
Edema lieve (bordi dell'area ben definiti da gonfiore visibile)…	2
Edema moderato (rigonfiamento di circa 1 mm)…	3
Edema grave (rigonfiamento di oltre 1 mm ed esteso oltre la zona di esposizione)…	4

Massimo possibile: 4

Per chiarire le reazioni dubbie è possibile eseguire un esame istopatologico.

▼**M8**

APPENDICE

DEFINIZIONI

Sostanza chimica: una sostanza o miscela.

Irritazione cutanea: il manifestarsi di lesioni reversibili della pelle a seguito dell'applicazione della sostanza chimica in esame per non più di quattro ore.

Corrosione cutanea: il manifestarsi di lesioni irreversibili della pelle, segnatamente necrosi visibile dell'epidermide e del derma, a seguito dell'applicazione della sostanza chimica in esame per non più di quattro ore. Effetti tipici della corrosione sono ulcere, emorragie, escare sanguinanti e, al termine del periodo di osservazione di quattordici giorni, alterazione del colore dovuta a pallore della cute, zone di completa alopecia e cicatrici. Per valutare le lesioni dubbie, considerare l'opportunità di eseguire un esame istopatologico.

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

▼M7

B.5. **IRRITAZIONE/CORROSIONE OCULARE ACUTA**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼B

B.6 **SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼M4

B.7. TOSSICITÀ A DOSE RIPETUTA (28 GIORNI) PER VIA ORALE NEI RODITORI

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 407 (2008). La prima linea guida n. 407 è stata adottata nel 1981. Nel 1995 è stata adottata una versione rivista per ottenere informazioni aggiuntive dagli animali utilizzati nello studio, in particolare in materia di neurotossicità e immunotossicità.

2. Nel 1998 l'OCSE ha avviato un'attività prioritaria relativa alla revisione delle linee guida esistenti e all'elaborazione di nuove linee guida per lo screening e le prove dei potenziali interferenti endocrini (8). Uno degli obiettivi era aggiornare la linea guida dell'OCSE n. 407 «Tossicità a dose ripetuta (28 giorni) per via orale nei roditori» introducendo dei parametri adatti per l'individuazione dell'attività endocrina delle sostanze in esame. Questo protocollo è stato sottoposto a un programma internazionale mirante a valutare la pertinenza e la praticabilità dei parametri addizionali, la prestazione di questi parametri per le sostanze chimiche con attività (anti)estrogenica, (anti)androgenica e (anti)tiroidea, la loro riproducibilità intra e inter-laboratori e la loro interferenza con i parametri richiesti dalla versione precedente della linea guida n. 407. I numerosi dati ottenuti sono stati raccolti e valutati attentamente in una relazione esaustiva dell'OCSE (9). Il presente metodo di prova B.7 (equivalente alla linea guida n. 407) è frutto dell'esperienza e dei risultati ottenuti nel corso del programma internazionale di prova. Consente di contestualizzare alcuni effetti endocrino-mediati con altri effetti tossicologici.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

3. Nella valutazione e nell'esame delle caratteristiche tossiche di una sostanza chimica è possibile determinare la tossicità orale utilizzando dosi ripetute dopo aver ottenuto dati preliminari sulla tossicità mediante test di tossicità acuta. Il presente metodo di prova mira a studiare gli effetti su una gamma molto ampia di potenziali bersagli di tossicità. Fornisce informazioni sui potenziali rischi per la salute che un'esposizione ripetuta può comportare in un arco di tempo relativamente limitato, tra cui gli effetti sul sistema nervoso, immunologico ed endocrino. In relazione a questi endpoint specifici, il metodo deve consentire di individuare le sostanze chimiche potenzialmente neurotossiche che potrebbero giustificare studi più approfonditi di questo aspetto, e le sostanze chimiche che interferiscono con la fisiologia della tiroide. Questo metodo può inoltre fornire dati sulle sostanze chimiche che incidono sugli organi riproduttivi maschili e/o femminili dei giovani animali adulti, evidenziando anche eventuali effetti immunologici.

4. I risultati del metodo di prova B.7 devono essere utilizzati per individuare i pericoli e valutare i rischi. I risultati ottenuti per quanto riguarda i parametri endocrini devono essere interpretati alla luce del «Quadro concettuale dell'OCSE per le prove e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino» (11). Il metodo prevede uno studio di base della tossicità a dosi ripetute che può essere utilizzato per le sostanze chimiche per le quali uno studio di 90 giorni non si giustifica (ad esempio quando il volume di produzione non supera determinate quantità) o prima di uno studio a lungo termine. Il periodo di esposizione deve essere di 28 giorni.

▼M4

5. Il programma internazionale realizzato per la convalida di parametri in grado di individuare l'attività endocrina di una sostanza in esame ha evidenziato che la qualità dei dati ottenuti con questo metodo di prova dipende in ampia misura dall'esperienza del laboratorio che effettua le prove. Ciò vale soprattutto per la determinazione istopatologica di cambiamenti ciclici negli organi riproduttori femminili e la determinazione del peso dei piccoli organi ormono-dipendenti che sono difficili da dissecare. È stato messo a punto un documento di orientamento sull'istopatologia (19), che è disponibile sul sito dell'OCSE nella rubrica relativa alle linee guida per le prove sulle sostanze chimiche. Il documento è destinato ad aiutare i patologi nelle loro analisi e a migliorare la sensibilità delle prove. Nel metodo di prova sono stati integrati svariati parametri indicativi di una tossicità per il sistema endocrino. Gli endpoint per i quali non sono disponibili dati sufficienti a dimostrane l'utilità o che, nell'ambito del programma di convalida, hanno dimostrato una scarsa capacità di individuare gli interferenti endocrini sono proposti come endpoint opzionali (cfr. appendice 2).

6. Sulla base dei dati generati nel corso del processo di validazione, occorre sottolineare che la sensibilità di questo saggio non è sufficiente per individuare tutte le sostanze caratterizzate da un'attività (anti)androgenica o (anti)estrogenica (9). Il presente metodo di prova deve essere eseguito in una fase della vita estremamente sensibile alle interferenze endocrine. Tuttavia questo metodo ha permesso, nel corso del processo di convalida, di individuare delle sostanze con un forte o un debole impatto sulla funzione tiroidea e delle sostanze che agiscono fortemente o in misura ridotta sul sistema endocrino mediante recettori dell'estrogeno o dell'androgeno; nella maggior parte dei casi, tuttavia, non ha consentito di individuare le sostanze con effetti endocrini che incidono in misura limitata su questi recettori. Questo metodo non può pertanto essere descritto come prova di screening dell'attività endocrina.

7. Di conseguenza l'assenza di effetti legati a questi meccanismi di azione non può essere considerata una prova dell'assenza di effetti sul sistema endocrino. Per quanto riguarda gli effetti endocrini-mediati, la caratterizzazione delle sostanze non deve basarsi unicamente sui risultati del presente metodo di prova ma deve essere utilizzata nell'ambito di un approccio fondato sull'«onere della prova» che integri tutti i dati esistenti su una sostanza chimica per caratterizzarne la potenziale attività endocrina. Per questa ragione, le decisioni di tipo regolamentare relative all'attività endocrina delle sostanze chimiche (caratterizzazione dei composti) devono avvalersi di un approccio di ampio respiro, e non fondarsi solo sui risultati di questo metodo di prova.

8. Naturalmente tutte le procedure che prevedono l'utilizzo di animali rispetteranno le norme locali in materia di cura degli animali. Le descrizioni delle cure e dei trattamenti riportate qui di seguito corrispondono a norme di prestazione minime che, se del caso, sono sostituite dalla regolamentazione locale, qualora questa sia più rigorosa. Ulteriori indicazioni sul trattamento umano degli animali sono fornite dall'OCSE (14).

9. L'appendice 1 contiene le definizioni di termini utili ai fini del presente metodo.

PRINCIPIO DELLA PROVA

10. Ogni giorno, per un periodo di 28 giorni, si somministra per via orale la sostanza in esame in dosi crescenti a vari gruppi di animali da esperimento, laddove ad ogni gruppo corrisponde un determinato livello di dose. Durante il periodo di somministrazione gli animali vengono esaminati attentamente e quotidianamente al fine di rilevare eventuali segni di tossicità. Gli animali deceduti o oggetto di eutanasia durante la prova vengono sottoposti a autopsia. Al termine della prova gli animali superstiti vengono soppressi e sottoposti a autopsia. Uno studio a 28 giorni fornisce informazioni sugli effetti di un'esposizione ripetuta per via orale e può dimostrare la necessità

▼M4

di condurre ulteriori studi a più lungo termine. Può inoltre fornire informazioni sulla selezione delle concentrazioni in vista di studi a più lungo termine. I dati tratti dal metodo di prova devono permettere di caratterizzare la tossicità della sostanza in esame, avere un'indicazione sul rapporto dosaggio-risposta e determinare il NOAEL (*no-observed-adverse effects* — livello fino al quale non si osservano effetti dannosi).

DESCRIZIONE DEL METODO

Selezione delle specie animali

11. Il ratto è la specie preferita, ma sono ammesse anche altre specie di roditori. Se i parametri specificati nel metodo di prova B.7 sono studiati in un'altra specie di roditori occorre fornire una giustificazione dettagliata. Benché dal punto di vista biologico sia plausibile che altre specie rispondano ai prodotti tossici in modo simile ai ratti, l'utilizzo di specie più piccole può causare una maggiore variabilità dei risultati vista la difficoltà tecnica a sezionare organi di dimensioni inferiori. Nel programma internazionale di convalida per l'individuazione degli interferenti endocrini, il ratto è stata l'unica specie animale utilizzata. Si devono utilizzare animali adulti giovani e sani appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. La somministrazione deve iniziare il più presto possibile dopo lo svezzamento e comunque prima che gli animali abbiano raggiunto le nove settimane di vita. All'inizio dello studio la variazione di peso degli animali deve essere minima e non superare il ± 20 % del peso medio per ciascun sesso. Se uno studio di tossicità orale a dose ripetuta costituisce una tappa preliminare di uno studio a lungo termine, si utilizzano di preferenza animali provenienti dallo stesso ceppo e aventi la medesima origine in entrambi gli studi.

Stabulazione e alimentazione

12. Tutte le procedure devono attenersi agli standard locali in materia di cura degli animali da esperimento. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve essere almeno del 30 % e preferibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia del laboratorio, ma l'obiettivo da raggiungere è un'umidità del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua potabile. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di garantire un'adeguata miscela della sostanza in esame, se somministrata con questo metodo. Gli animali devono essere sistemati nelle gabbie in piccoli gruppi dello stesso sesso; possono essere sistemati in gabbie individuali se necessario per ragioni scientifiche. Ciascuna gabbia non deve ospitare più di cinque animali.

13. L'alimentazione deve essere analizzata periodicamente per verificare la presenza di contaminanti. Un campione del mangime somministrato deve essere conservato fino al completamento della relazione.

Preparazione degli animali

14. Gli animali adulti, sani e giovani vengono suddivisi a caso in gruppi di controllo e di trattamento. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Gli animali devono essere identificati in modo univoco e tenuti nelle gabbie per almeno 5 giorni prima dell'inizio dello studio, in modo da consentirne l'adattamento alle condizioni di laboratorio.

Preparazione delle dosi

15. La sostanza di prova viene somministrata per via intragastrica, oppure con la dieta o l'acqua. Il metodo di somministrazione orale dipende dallo scopo dello studio e dalle caratteristiche fisiche/chimiche/tossico-cinetiche della sostanza in esame.

▼M4

16. Ove necessario, la sostanza di prova è disciolta o sospesa in un veicolo adeguato. Si raccomanda di prendere in considerazione, in primis e ogni qualvolta possibile, l'uso di una soluzione/sospensione acquosa, e in seconda battuta l'uso di una soluzione/sospensione in olio (ad esempio olio di semi di mais) e infine la possibile soluzione in altri veicoli. Se si usano veicoli diversi dall'acqua è necessario conoscerne le caratteristiche tossiche. È necessario determinare la stabilità della sostanza di prova nel veicolo.

PROCEDURA

Numero e sesso degli animali

17. Per ciascun livello di dosaggio dovranno essere utilizzati almeno 10 animali (5 di sesso femminile e 5 di sesso maschile). Se si prevedono sacrifici intermedi, il numero deve essere aumentato del numero di animali che si prevede di sottoporre a eutanasia prima del completamento dello studio. Si può considerare di includere un gruppo satellite supplementare di dieci animali (5 per sesso) nel gruppo di controllo e nel gruppo trattato con la dose più elevata al fine di monitorare la reversibilità, la persistenza, l'insorgenza ritardata di effetti tossici, per almeno 14 giorni dopo il trattamento.

Dosaggio

18. In genere si devono utilizzare almeno tre gruppi di trattamento e un gruppo di controllo; tuttavia, se la valutazione di altri dati porta a prevedere l'assenza di effetti a una dose ripetuta di 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno, può essere eseguito un saggio limite. Per stabilire le dosi da utilizzare, in mancanza di dati adeguati si può effettuare uno studio preliminare di tipo «range finding». Fatta eccezione per la somministrazione della sostanza in esame, gli animali del gruppo di controllo devono essere trattati in modo identico agli esemplari del gruppo di trattamento. Se si usa un veicolo per la somministrazione della sostanza in esame, al gruppo di controllo verrà somministrato il medesimo veicolo nel volume massimo utilizzato.

19. I livelli di dosaggio devono essere selezionati tenendo conto di tutti i dati esistenti sulla tossicità e le caratteristiche (tossico-)cinetiche della sostanza in esame o di sostanze affini. Il livello massimo di dosaggio deve essere tale da indurre effetti tossici senza cagionare la morte o sofferenze gravi. Deve inoltre essere selezionata una serie decrescente di dosaggi al fine di individuare eventuali risposte dosi-correlate e il livello fino al quale non si osservano effetti dannosi (NOAEL). In genere, per determinare i livelli decrescenti di dosaggio si consiglia un intervallo con un fattore compreso tra 2 e 4 e spesso è preferibile aggiungere un quarto gruppo di prova piuttosto che avere un intervallo eccessivamente lungo (ad esempio superiore a un fattore 10) fra un dosaggio e l'altro.

20. Nel caso di tossicità generale osservata (ad esempio riduzione del peso corporeo, effetti a livello epatico, cardiaco, polmonare o renale ecc.) o di altri cambiamenti che potrebbero non essere dovuti ad effetti tossici (diminuzione dell'assunzione di alimenti, dilatazione del fegato), gli effetti rilevati sugli endpoint neurologici, endocrini o legati al sistema immunitario devono essere interpretati con cautela.

Prova limite

21. Se una prova, effettuata secondo le procedure descritte per il presente studio, con un livello di dose di almeno 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno o in caso di somministrazione con gli alimenti o l'acqua, ad una concentrazione equivalente (in funzione del peso corporeo), non produce effetti tossici osservabili e se i dati relativi a sostanze di struttura analoga non indicano tossicità, si può considerare che non è necessario eseguire uno studio completo utilizzando tre livelli di dose. Si effettua il saggio limite, tranne quando i dati sull'esposizione umana indicano la necessità di utilizzare un livello di dose più elevato.

▼M4

Somministrazione delle dosi

22. La sostanza in esame è somministrata agli animali giornalmente, sette giorni su sette, per un periodo di 28 giorni. Se viene effettuata per via intragastrica, la somministrazione deve avvenire in dose singola mediante sonda gastrica o idonea cannula per intubazione. Il volume massimo di liquido somministrabile in una volta sola dipende dalla taglia dell'animale, ma non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo, tranne nel caso delle soluzioni acquose per le quali si possono prevedere fino a 2 ml/100 g di peso corporeo. Salvo nel caso di sostanze chimiche irritanti o corrosive, i cui effetti di norma tendono a esacerbarsi con l'aumentare della concentrazione, la variabilità del volume somministrato deve essere ridotta al minimo adeguando la concentrazione, in modo da mantenere un volume costante per tutti i livelli di dose.

23. Per le sostanze somministrate con la dieta o l'acqua è importante impedire che la quantità della sostanza in esame interferisca con la normale alimentazione o il normale bilancio dei liquidi. Se la sostanza in esame è somministrata con la dieta, si può utilizzare una concentrazione costante nella dieta (ppm) o un livello di dose costante in funzione del peso corporeo di ciascun animale, avendo cura di specificare quale sia l'alternativa prescelta. Se la sostanza è somministrata per via intragastrica, la dose deve essere somministrata ogni giorno alla stessa ora e all'occorrenza modificata per mantenere costante il livello di dose rispetto al peso dell'animale. Qualora, prima di uno studio a lungo termine, si effettui uno studio preliminare a dose ripetuta, la dieta degli animali deve essere identica nei due studi.

Osservazioni

24. Il periodo di osservazione ha una durata di 28 giorni. Gli animali del gruppo satellite destinato al monitoraggio di follow up devono essere esaminati per almeno ulteriori 14 giorni senza alcun trattamento, al fine di individuare l'insorgenza tardiva, la persistenza o la scomparsa degli effetti tossici.

25. Le osservazioni cliniche generali devono essere effettuate almeno una volta al giorno, preferibilmente alla stessa ora e tenendo conto del periodo di massima intensità degli effetti previsti dopo la somministrazione. Si registrano le informazioni concernenti le condizioni di salute degli animali. Almeno due volte al giorno, tutti gli animali vengono esaminati al fine di determinare la morbilità e la mortalità.

26. Una volta prima dell'esposizione iniziale (per consentire un confronto sullo stesso soggetto) e, successivamente, almeno una volta la settimana tutti gli animali vengono sottoposti ad osservazioni cliniche particolareggiate. Queste osservazioni devono essere eseguite fuori dalle gabbie, collocando gli animali in un recinto standard, di preferenza sempre alla stessa ora. Occorre registrare con cura le osservazioni, preferibilmente usando sistemi di punteggio statistico definiti appositamente dal laboratorio di prova. Si avrà cura di ridurre al minimo le variazioni delle condizioni sperimentali; le osservazioni devono essere effettuate da persone che non sono a conoscenza del trattamento somministrato. Si terrà conto, tra l'altro, di tutte le alterazioni della cute, del pelo, degli occhi, delle mucose, della comparsa di secrezioni ed escrezioni e dell'attività autonomica (per esempio lacrimazione, piloerezione, ampiezza pupillare, ritmo respiratorio insolito). Vanno inoltre registrati cambiamenti dell'andatura, della postura e della risposta alla manipolazione, nonché la presenza di movimenti clonici o tonici, stereotipie (ad esempio tolettatura eccessiva, continuo girare in cerchio) o comportamenti insoliti (ad esempio automutilazione, marcia a ritroso) (2).

27. Nella quarta settimana di esposizione si procede alla valutazione della reattività sensoriale a diversi tipi di stimolo (2) (per esempio uditivi, visivi e propriocettivi) (3) (4) (5), della forza prensile (6) e dell'attività motoria (7). Ulteriori indicazioni sulle procedure utilizzabili sono contenute nelle voci bibliografiche citate. Tuttavia possono essere applicate procedure alternative non indicate nella bibliografia.

▼M4

28. Le osservazioni funzionali previste per la quarta settimana di esposizione possono essere evitate nel caso di uno studio preliminare ad un successivo studio subcronico (90 giorni). In questa eventualità, le osservazioni funzionali devono essere incluse nello studio complementare. D'altro canto, le informazioni ricavate dalle osservazioni funzionali nel corso dello studio a dose ripetuta possono essere utili nella determinazione dei livelli di dosaggio per un successivo studio subcronico.

29. Eccezionalmente è possibile omettere le osservazioni funzionali per i gruppi che evidenzino comunque segni di tossicità tali da interferire in modo significativo con l'esecuzione degli esami funzionali.

30. Nel corso dell'autopsia, si può (eventualmente) determinare il ciclo estrale per tutte le femmine mediante un Paptest. Queste osservazioni forniscono informazioni sullo stadio del ciclo estrale al momento dell'eutanasia e agevoleranno la valutazione istologica dei tessuti sensibili agli estrogeni [cfr. Linee guida sull'istopatologia (19)].

Peso corporeo e consumo di cibo/acqua

31. Tutti gli animali devono essere pesati almeno una volta la settimana e il consumo di cibo deve essere determinato almeno una volta la settimana. Se la sostanza in esame viene somministrata con l'acqua, anche il consumo di acqua va misurato almeno una volta la settimana.

Ematologia

32. Al termine del periodo di prova, occorre procedere agli esami ematologici seguenti: ematocrito, concentrazioni di emoglobina, conteggio degli eritrociti, reticulociti, conteggio totale e differenziale dei leucociti, numero di placchette e misura del tempo e del potenziale di coagulazione. Se la sostanza in esame o i suoi metaboliti putativi hanno o possono avere proprietà ossidanti occorre effettuare altre analisi, relative tra l'altro alla concentrazione di metaemoglobine o ai corpi di Heinz.

33. I campioni di sangue devono essere prelevati da un determinato sito immediatamente prima o durante l'eutanasia degli animali e conservati in condizioni adeguate. Gli animali devono essere a digiuno la notte prima dell'eutanasia ([1]).

Biochimica clinica

34. Gli esami biochimico-clinici finalizzati allo studio dei principali effetti tossici sui tessuti e, in particolare, sui reni e sul fegato devono essere effettuati su campioni di sangue prelevati da tutti gli animali immediatamente prima o durante la loro soppressione (eccetto gli animali trovati moribondi e/o soppressi nel corso dello studio). Le analisi sul plasma o sul siero comprenderanno il sodio, il potassio, il glucosio, il colesterolo totale, l'urea, la creatinina, le proteine totali e l'albumina, almeno due enzimi indicatori degli effetti epatocellulari (come l'alanina aminotransferasi, l'aspartato aminotransferasi, la fosfatasi alcalina, la gamma-glutamil transpeptidasi e la glutammato-deidrogenasi). Le determinazioni di altri enzimi (di origine epatica o di altro tipo) e della bilirubina possono talvolta fornire indicazioni utili.

35. A titolo facoltativo, nel corso dell'ultima settimana dello studio, si possono effettuare le seguenti analisi delle urine su campioni raccolti in momenti specifici: aspetto, volume, osmolalità o densità relativa, pH, proteine, glucosio e sangue/cellule ematiche.

([1]) Per svariate misurazioni del siero e del plasma, e soprattutto per il glucosio, sarebbe preferibile mantenere il digiuno per tutta la notte. Il motivo principale è che l'aumento della variabilità dovuto inevitabilmente al mancato digiuno tenderebbe a mascherare effetti meno evidenti rendendo più difficile l'interpretazione. D'altro lato, però, il digiuno notturno può interferire con il metabolismo generale degli animali e, soprattutto negli studi sull'alimentazione, può incidere sull'esposizione quotidiana alla sostanza in esame. Se si opta per il digiuno notturno, gli esami biochimico-clinici dovranno essere effettuati dopo le osservazioni funzionali della quarta settimana.

▼M4

36. È inoltre necessario considerare la possibilità di condurre studi sul plasma o sui marker sierologici dei danni generici ai tessuti. Altre determinazioni dovranno essere eseguite qualora si abbia motivo di ritenere o di sospettare che le proprietà della sostanza in esame possano alterare i profili metabolici riguardanti il calcio, il fosfato, i trigliceridi, gli ormoni specifici e la colinesterasi. Queste analisi vanno effettuate per alcune classi di sostanze chimiche oppure caso per caso.

37. Anche se la valutazione internazionale degli endpoint legati al sistema endocrino non è riuscita a stabilire in modo chiaro il vantaggio dell'analisi degli ormoni tirodei (T3, T4) e della TSH, potrebbe essere utile conservare dei campioni di plasma o di siero per misurare la T3, la T4 e la TSH (opzionale) se vi sono indicazioni di un effetto sull'asse ipofiso-tiroideo. Per lo stoccaggio questi campioni possono essere congelati a - 20°. I fattori seguenti possono influenzare la variabilità e le concentrazioni assolute delle analisi ormonali:

— momento dell'eutanasia, per via della variazione diurna delle concentrazioni ormonali,

— metodi di eutanasia, evitando di stressare inutilmente gli animali in quanto ciò potrebbe incidere sulle concentrazioni ormonali,

— kit per le analisi ormonali che possono differire per le loro curve standard.

L'identificazione definitiva delle sostanze chimiche che agiscono sul sistema tiroideo è più affidabile se si fonda sull'analisi istopatologica più che sui livelli ormonali.

38. I campioni di plasma destinati specificatamente all'analisi ormonale devono essere prelevati nelle stesse ore della giornata. Si raccomanda di tenere conto dei tassi di T3, T4 e TSH provocati da alterazioni dell'istopatologia della tiroide. I valori numerici ottenuti dalle analisi delle concentrazioni ormonali differiscono in funzione dei kit disponibili in commercio utilizzati. Pertanto non è sempre possibile fornire criteri di prestazione fondati su dati storici omogenei. In alternativa, i laboratori devono fare il possibile per mantenere i coefficienti di variazione al di sotto di 25 per la T3 e la T4 e di 35 per la TSH. Tutte le concentrazioni devono essere annotate in ng/ml.

39. Se i dati di riferimento storici sono inadeguati, occorre tenere conto delle variabili ematologiche e di biochimica clinica prima di iniziare i dosaggi, di preferenza su un gruppo di animali diverso dal gruppo in esame.

PATOLOGIA

Autopsia macroscopica

40. Tutti gli animali dello studio vanno sottoposti ad un'autopsia macroscopica completa e dettagliata che comprenda un attento esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi e delle cavità cranica, toracica e addominale e del loro contenuto. Il fegato, i reni, le ghiandole surrenali, i testicoli, gli epididimi, l'insieme composto dalla prostata e le vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione, il timo, la milza, il cervello e il cuore di tutti gli animali (tranne quelli trovati moribondi e/o sacrificati prima del completamento dello studio) vanno opportunamente liberati da eventuali tessuti aderenti e pesati immediatamente dopo l'ablazione, per evitare l'essiccamento. Occorre prelevare con cautela l'insieme della prostata in modo da evitare di perforare le vescicole seminali piene di liquido. In alternativa si può liberare la vescicola seminale e la prostata dai tessuti aderenti e pesarli previa fissazione.

▼M4

41. Eventualmente, per evitare il disseccamento, subito dopo la dissezione si possono pesare due altri organi: le due ovaie (peso a umido) e l'utero, ivi compreso il collo dell'utero [gli orientamenti sull'ablazione e la preparazione dei tessuti uterini ai fini del loro peso sono contenuti nella linea guida dell'OCSE n. 440 (18)].

42. Il peso della tiroide (facoltativo) può essere stabilito dopo la fissazione. Anche in questo caso l'ablazione deve essere eseguita con cautela e solo previa fissazione per evitare di danneggiare i tessuti. L'eventuale danneggiamento dei tessuti infatti potrebbe compromettere l'analisi istopatologica.

43. I seguenti tessuti vanno conservati nel mezzo di fissazione più appropriato sia per il tipo di tessuto, sia per l'esame istopatologico che si intende effettuare successivamente (cfr. paragrafo 47): tutte le lesioni macroscopiche, cervello (porzioni rappresentative comprendenti cervello, cervelletto, bulbo e ponte), midollo spinale, occhi, stomaco, intestino tenue e crasso (comprese le placche di Peyer), fegato, reni, ghiandole surrenali, milza, cuore, trachea e polmoni (conservati con dilatazione mediante fissativo e poi immersione), gonadi (testicoli e ovaie), organi sessuali accessori (utero e collo dell'utero, epididimi, prostata + vescicole seminali con ghiandole della coagulazione), vagina, vescica e linfonodi [oltre al linfonodo più vicino un altro linfonodo, in funzione dell'esperienza del laboratorio (15)], nervo periferico (sciatico o tibiale) preferibilmente in prossimità del muscolo, muscolo e osso dello scheletro con il midollo osseo (una sezione/o un preparato fresco di midollo osseo aspirato). Si raccomanda di fissare i testicoli mediante immersione in un fissativo di Bouin o di Davidson modificato (16) (17). La tunica albuginea deve essere perforata, con un ago, con delicatezza e superficialmente in entrambi i poli dell'organo per consentire la rapida penetrazione del fissativo. I reperti clinici e di altro tipo possono evidenziare la necessità di esaminare altri tessuti. Vanno inoltre conservati tutti gli organi considerati organi bersaglio in base alle proprietà note della sostanza in esame.

44. I tessuti elencati qui di seguito possono apportare informazioni utili sugli effetti endocrini: gonadi (ovaie e testicoli), organi sessuali accessori (utero, collo dell'utero, epididimi, vescicole seminali con ghiandole di coagulazione, prostata dorso laterale e ventrale), vagina, ipofisi, ghiandola mammaria maschile, tiroide e ghiandola surrenale. Non ci sono sufficienti riscontri di alterazioni nelle ghiandole mammarie maschili, ma questo parametro può essere molto sensibile alle sostanze con attività estrogenica. L'osservazione degli organi/tessuti non ripresi nel paragrafo 43 è facoltativa (cfr. appendice 2).

45. Il documento di orientamento sull'istopatologia (19) fornisce informazioni supplementari sulla dissezione, la fissazione, l'asportazione e l'istopatologia dei tessuti endocrini.

46. Nel corso del programma internazionale di prove, è stato rilevato che gli effetti endocrini poco evidenti, dovuti a sostanze chimiche in grado di squilibrare leggermente l'omeostasi degli ormoni sessuali, possono essere individuati dalla loro capacità di interferire sulla sincronizzazione del ciclo estrale in vari tessuti più che da evidenti alterazioni istopatologiche degli organi sessuali femminili. Sebbene non vi siano prove inconfutabili in tal senso, si raccomanda di tenere conto, nell'interpretazione dell'esame istologico delle ovaie, di una possibile asincronia del ciclo estrale (cellule follicolari, tecali e della granulosa). Se si esamina la fase del ciclo mediante un Paptest, si può tenere conto anche di questo dato come elemento di confronto aggiuntivo.

▼M4

Esame istopatologico

47. Gli organi e i tessuti conservati di tutti gli animali del gruppo di controllo e del gruppo trattato con la dose più elevata vanno sottoposti a un esame istopatologico completo. Si procede a questi esami anche sugli animali degli altri gruppi se nel gruppo cui viene somministrata la dose più elevata si osservano alterazioni correlate al trattamento.

48. Si procederà all'esame di tutte le lesioni macroscopiche.

49. Quando si utilizza un gruppo satellite l'esame istopatologico va eseguito sui tessuti e sugli organi per i quali sono stati osservati effetti nei gruppi trattati.

DATI E RELAZIONE

Dati

50. Devono essere riportati i dati individuali su ciascun animale. Inoltre, tutti i dati vanno riassunti sotto forma di tabelle che indichino per ogni gruppo di trattamento il numero di animali all'inizio della prova, il numero di animali trovati morti durante la prova o sottoposti a eutanasia per motivi umanitari e il momento di tutti i decessi/soppressioni, il numero di animali che manifestano segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati con indicazione del momento dell'insorgenza, della durata e della gravità di tutti gli effetti tossici, il numero di animali che presentano lesioni, il tipo di lesioni e la percentuale di animali che manifesta ciascun tipo di lesione.

51. Se possibile, i risultati numerici devono essere valutati sulla base di un metodo statistico appropriato e comunemente accettato. I confronti degli effetti osservati nell'ambito di un intervallo di dosaggio deve rendere inutile l'utilizzo di prove t multiple. I metodi statistici devono essere selezionati durante la fase di progettazione dello studio.

52. Ai fini del controllo di qualità, si suggerisce di raccogliere dati di controllo storici e di calcolare i coefficienti di variazione per i dati numerici, in particolare per i parametri legati all'individuazione degli interferenti endocrini. Questi dati possono essere utilizzati, a fini di confronto, in fase di valutazione degli studi effettivamente realizzati.

Relazione sulla prova

53. La relazione deve contenere le seguenti informazioni:

Sostanza chimica in esame:

— natura fisica, purezza e proprietà fisico-chimiche,

— dati identificativi.

Veicolo (se del caso):

— motivazione della scelta del veicolo, se diverso dall'acqua.

Animali sperimentali:

— specie/ceppo impiegati,

— numero, età e sesso degli animali,

— provenienza, stabulazione, dieta ecc.,

— peso di ciascun animale all'inizio della prova,

— qualora non siano stati utilizzati ratti, occorre spiegarne il motivo.

Condizioni sperimentali:

— criteri di selezione delle dosi,

— informazioni dettagliate sulla formulazione della sostanza chimica in esame/preparazione della dieta, sulla concentrazione utilizzata, sulla stabilità e sull'omogeneità del preparato,

▼**M4**

— modalità precise di somministrazione della sostanza chimica in esame,

— se del caso, conversione della concentrazione della sostanza nella dieta o nell'acqua (ppm) in dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno),

— informazioni dettagliate sulla qualità degli alimenti e dell'acqua.

Endpoint facoltativi esaminati:

— elenco degli endpoint facoltativi esaminati.

Risultati:

— peso corporeo/variazioni del peso corporeo,

— assunzione di cibo, ed eventualmente di acqua,

— dati sulla risposta tossica per sesso e livello di dose, compresi segni di tossicità,

— natura, gravità e durata degli effetti clinici (sia reversibili che non reversibili),

— valutazione dell'attività sensoriale, della forza prensile e dell'attività motoria,

— test ematologici con i relativi valori basali,

— test biochimici clinici con i relativi valori basali,

— peso corporeo al momento dell'eutanasia e dati sul peso degli organi,

— referti autoptici,

— descrizione dettagliata di tutti i risultati istopatologici,

— dati sull'assorbimento, se disponibili,

— elaborazione statistica dei risultati, se del caso.

Discussione dei risultati

Conclusioni

▼**M4**

Appendice 1

DEFINIZIONI

Androgenicità: la capacità di una sostanza chimica di agire come un ormone androgenico naturale (ad esempio il testosterone) in un mammifero.

Antiandrogenicità: la capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività di un ormone androgenico naturale (ad esempio il testosterone) in un mammifero.

Antiestrogenicità: la capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività di un ormone estrogenico naturale (ad esempio estradiolo 17ß) in un mammifero.

Attività antitiroidea: la capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività di un ormone tiroideo naturale (ad es T_3.) in un mammifero.

Dosaggio: termine generale che indica la dose, la frequenza e la durata della somministrazione.

Dose: quantità di sostanza somministrata. La dose è espressa col peso della sostanza in esame per unità di peso corporeo dell'animale testato per giorno (mg/kg peso corporeo/giorno) o come una concentrazione costante nella dieta.

Tossicità evidente: termine generale che designa i segnali evidenti di tossicità a seguito della somministrazione di una sostanza. Questi segni devono essere sufficienti per consentire la valutazione dei pericoli ed essere tali che si possa prevedere che l'aumento della dose somministrata comporti la comparsa di segni di tossicità grave e probabilmente la mortalità.

NOAEL è l'abbreviazione di *no-observed-adverse-effect level*, ossia la dose più elevata alla quale non si osservano effetti avversi legati al trattamento.

Estrogenicità: la capacità di una sostanza chimica di agire come un ormone estrogenico naturale (ad esempio estradiolo 17ß) in un mammifero.

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

Attività tiroidea: la capacità di una sostanza chimica di agire come un ormone tiroideo naturale (ad es T_3.) in un mammifero.

Validazione è un processo scientifico destinato a caratterizzare le prescrizioni e i limiti operativi di un metodo di prova e a dimostrarne l'affidabilità e la pertinenza per un obiettivo specifico.

▼M4

Appendice 2

Endpoint raccomandati nel metodo di prova B.7 per l'individuazione degli interferenti endocrini

Endpoint obbligatori	Endpoint facoltativi
Peso	
— Testicoli — Epididimi — Ghiandole surrenali — Prostata + vescicole seminali con ghiandole della coagulazione	— Ovaie — Utero, ivi compreso il collo dell'utero — Tiroide
Esame istopatologico	
— Gonadi: — Testicoli e — Ovaie — Organi sessuali accessori: — Epididimi, — Prostata + vescicole seminali con ghiandole della coagulazione — Utero, ivi compreso il collo dell'utero — Ghiandole surrenali — Tiroide — Vagina	— Paptest — Ghiandole mammarie maschili — Ipofisi
Dosaggi ormonali	
	— Livelli di T3 e T4 circolanti — Livelli di TSH circolante

BIBLIOGRAFIA

(1) OCSE (Parigi, 1992) Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

(2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to.Chemicals, Environmental Health Criteria Document No. Environmental Health Criteria Document No. 60

(3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1 003.

(4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691-704.

(5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

▼M4

(7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(8) OCSE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11 March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(9) OCSE (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

(10) OCSE (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

(11) OCSE (2012). Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html

(12) OCSE (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

(13) OCSE. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

(14) OCSE (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404-407.

(16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pagg. 52-85.

(17) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.

(18) OCSE (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals N° 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

(19) OCSE (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

B.8. **TOSSICITÀ SUBACUTA PER INALAZIONE: STUDIO A 28 GIORNI**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼B

B.9. TOSSICITÀ A DOSE RIPETUTA (28 GIORNI) PER VIA CUTANEA

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

Vedi introduzione generale, parte B (punto A).

1.2. DEFINIZIONI

Vedi introduzione generale, parte B (punto B).

1.3. SOSTANZA DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

La sostanza in esame è applicata ogni giorno sulla pelle di alcuni gruppi di animali da esperimento, in dosi graduate, un livello di dose per gruppo, per un periodo di 28 giorni. Durante il periodo di applicazione, gli animali vengono osservati quotidianamente per rilevare i sintomi di tossicità. Si sottopongono a necroscopia gli animali morti durante la prova e al termine del saggio vengono sottoposti a necroscopia gli animali sopravvissuti.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

Nessuno.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

1.6.1. **Preparazioni**

Per un periodo di almeno 5 giorni prima della prova gli animali sono mantenuti nelle stesse condizioni di stabulazione e di alimentazione del saggio. Prima del saggio gli animali, che dovranno essere giovani e sani, sono scelti con metodo casuale e assegnati ai gruppi previsti per il trattamento e per il controllo. Poco prima dell'esperimento si effettua il taglio del pelo nella parte dorsale del corpo degli animali. Si può procedere alla rasatura, ma essa dovrebbe essere effettuata circa 24 ore prima dell'esperimento. Di norma è necessario ripetere il taglio o la rasatura a intervalli di circa una settimana. Durante il taglio o la rasatura si dovrà badare a non ledere la cute dell'animale. Per l'applicazione della sostanza in esame, si dovrebbe preparare almeno il 10 % della superficie corporea. Nel determinare l'entità dell'area da preparare e le dimensioni della copertura è opportuno tenere presente il peso dell'animale. Le sostanze solide, che possono essere ridotte in polvere se appropriato, dovranno essere inumidite sufficientemente con acqua o, se necessario, con un veicolo adatto ad assicurare un buon contatto con la pelle. In generale le sostanze liquide sono saggiate in forma non diluita. Dal punto di vista ottimale, applicazioni quotidiane vengono effettuate sulla base di 5-7 giorni per settimana.

1.6.2. **Condizioni per il saggio**

1.6.2.1. *Animali per l'esperimento*

Possono essere utilizzati ratti adulti, conigli o porcellini d'India. Si possono utilizzare altre specie animali, ma il loro uso dovrà essere giustificato.

▼B

All'inizio dello studio l'intervallo di variazione di peso degli animali non dovrebbe superare ± 20 % del valore medio

1.6.2.2. *Numero e sesso*

Per ciascun livello di dosaggio dovrebbero essere utilizzati almeno 10 animali (5 di sesso femminile e 5 di sesso maschile) con cute sana. Le femmine dovrebbero essere nullipare e non gravide. Qualora siano stati programmati sacrifici intermedi di alcuni animali, il numero degli animali dovrà essere aumentato per includere quello degli animali da sacrificare prima del termine della prova. Inoltre, un altro gruppo (gruppo satellite) di 10 animali (5 animali per sesso) può essere sottoposto al trattamento con il livello massimo di dosaggio per 28 giorni e tenuto in osservazione per 14 giorni dopo il trattamento per rilevare la reversibilità, la persistenza o l'insorgenza ritardata degli effetti tossici. Inoltre si utilizzerà in tale caso pure un gruppo satellite di 10 animali di controllo (5 animali per sesso).

1.6.2.3. *Livelli di dosaggio*

Sono richiesti almeno 3 livelli di dosaggio, almeno 6 ore al giorno, con un gruppo di controllo oppure, nel caso venga usato un veicolo, con un gruppo di controllo del veicolo. L'applicazione della sostanza in esame dovrebbe essere effettuata ogni giorno alla stessa ora e modificata ad intervalli (settimanali e bisettimanali) al fine di mantenere un livello di dosaggio costante in funzione del peso dell'animale. Gli animali del gruppo di controllo dovranno essere trattati in modo identico agli animali del saggio, ad eccezione che per l'applicazione delle sostanze da saggiare. Se, per facilitare il dosaggio, viene utilizzato un veicolo, al gruppo di controllo dovrà essere somministrato il veicolo allo stesso modo che ai gruppi trattati e nella stessa quantità somministrata al gruppo con il dosaggio più elevato. Il livello di dosaggio più elevato della sostanza in esame dovrebbe causare effetti tossici ma senza causare mortalità oppure causando una mortalità molto limitata. Il livello di dosaggio più basso non dovrebbe provocare alcun sintomo di tossicità. Nei casi in cui vi sia una stima utilizzabile dell'esposizione umana, il livello di dosaggio più basso dovrebbe superarla. Dal punto di vista ottimale, il livello intermedio dovrebbe provocare effetti tossici osservabili minimi. Nei casi in cui siano usati più livelli di dosaggio intermedi, essi dovrebbero essere intervallati al fine di causare una graduazione di effetti tossici. Nei gruppi a livello di dosaggio basso e medio e di controllo, l'incidenza dei decessi dovrebbe essere bassa per consentire una valutazione significativa dei risultati.

Se l'applicazione della sostanza in esame dovesse causare una grave irritazione della cute, sarà opportuno ridurne le concentrazioni, e ciò può causare una diminuzione oppure l'assenza degli altri effetti tossici al livello di dosaggio più elevato. Inoltre, se la cute à stata gravemente danneggiata, può essere necessario interrompere il saggio e iniziarne uno nuovo a concentrazioni più basse.

1.6.2.4. *Saggio limite*

Qualora un saggio preliminare, effettuato con un livello di dosaggio di 1 000 mg/kg di peso corporeo, oppure con una dose superiore in relazione all'eventuale esposizione umana, se nota, non causi effetti tossici, ulteriori saggi possono essere considerati non necessari.

1.6.2.5. *Periodo di osservazione*

Gli animali da esperimento dovrebbero essere esaminati quotidianamente al fine di rilevare i segni della tossicità. Il momento del decesso e quello in cui appaiono e scompaiono i sintomi di tossicità dovrebbero essere registrati.

▼B

1.6.3. **Procedimento**

Ogni gabbia dovrebbe contenere un solo animale. Da un punto di vista ottimale, la sostanza in esame viene applicata agli animali 7 giorni la settimana per un periodo di 28 giorni. Gli animali di ogni eventuale gruppo satellite previsto per proseguire le osservazioni dovrebbero essere tenuti per altri 14 giorni, senza subire trattamenti, al fine di rilevare l'eventuale guarigione o la persistenza degli effetti tossici, La durata dell'esposizione dovrebbe essere almeno di 6 ore/giorno.

La sostanza in esame dovrebbe essere applicata uniformemente su un'area pari a circa il 10 % della superficie corporea totale. Per le sostanze altamente tossiche, la superficie coperta può essere inferiore, ma la maggior parte dell'area trattata dovrebbe essere ricoperta da uno strato per quanto possibile sottile e uniforme.

Durante il periodo di esposizione, la sostanza in esame viene tenuta a contatto della cute mediante una garza porosa e un cerotto non irritante. La parte su cui viene applicata la sostanza dovrà essere ulteriormente coperta in modo opportuno per tenere ferma la garza e la sostanza in esame e affinché gli animali non possano ingerire la sostanza stessa. Dispositivi per la limitazione dei movimenti possono essere utilizzati per impedire agli animali di ingerire la sostanza in esame, ma non è consigliabile l'immobilizzazione completa dell'animale. Come alternativa si può usare un «dispositivo protettivo a collare».

Alla fine del periodo di esposizione, la sostanza residua dovrà essere rimossa utilizzando acqua, se possibile, o altri prodotti idonei per la pulizia della pelle.

Tutti gli animali dovranno essere esaminati quotidianamente e dovranno essere registrati i segni di tossicità, inclusi il momento dell'insorgenza, il loro grado e durata. Le osservazioni dovrebbero includere le alterazioni della cute e del pelo, degli occhi e delle membrane mucose, e anche dei sistemi respiratorio, circolatorio, nervoso autonomo e centrale, dell'attività somatomotoria e del comportamento dell'animale. La misura del peso degli animali dovrà essere effettuata ogni settimana. Si raccomanda, inoltre, che il consumo sia anche misurato ogni settimana. L'esame periodico degli animali è necessario per impedire la perdita degli animali dello studio, dovuta a cause come cannibalismo, autolisi dei tessuti o errata collocazione. Al termine del saggio, tutti gli animali sopravvissuti, ad eccezione del gruppo satellite, sono sottoposti a necroscopia. Gli animali moribondi e gli animali in condizioni di grave sofferenza o dolore dovranno essere rimossi appena notati, soppressi umanamente e sottoposti a necroscopia.

Al termine del saggio tutti gli animali, compresi quelli di controllo, saranno sottoposti ai seguenti esami:

i) ematologia, comprendente almeno l'ematocrito, la concentrazione di emoglobina, la conta degli eritrociti, la conta totale e differenziale dei leucociti e una misura del potenziale di coagulazione;

ii) biochimica clinica del sangue, comprendente almeno un parametro della funzionalità epatica e renale nel siero: alanina aminotransferasi (prima conosciuta come glutammico-piruvico transaminasi), aspartato aminotransferasi (prima conosciuta come glutammico-ossalacetico transaminasi), azoto ureico, albumina, creatinina ematica, bilirubina totale e proteine seriche totali.

Altre determinazioni, che possono risultare necessarie per un'adeguata valutazione tossicologica, comprendono il calcio, il fosforo, il cloruro, il sodio, il potassio, il glucosio a digiuno, l'analisi dei lipidi, gli ormoni, l'equilibrio acido/base, la metaemoglobina, l'attività colinesterasica.

▼B

Per estendere l'indagine degli effetti osservati, se necessario, si possono utilizzare ulteriori esami biochimico-clinici.

1.6.4. **Necroscopia**

Tutti gli animali dello studio dovranno essere sottoposti a necroscopia completa. Per evitare la disidratazione, il fegato, i reni, le ghiandole surrenali e i testicoli dovrebbero essere pesati umidi al più presto possibile dopo la dissezione. Gli organi e i tessuti, cioè la cute normale e trattata, il fegato, i reni, la milza, i testicoli, le ghiandole surrenali, il cuore e gli organi bersaglio (cioè gli organi che presentano lesioni macroscopiche o variazioni di dimensioni) dovranno essere conservati in un mezzo adatto per l'eventuale futuro esame istopatologico.

1.6.5. **Esame istopatologico**

Gli organi e i tessuti degli animali del gruppo ad alto dosaggio e del gruppo di controllo opportunamente preservati dovranno essere sottoposti ad esame istologico. Gli organi e i tessuti che presentano lesioni attribuibili alla sostanza in esame somministrata al dosaggio più elevato dovranno essere esaminati anche per i gruppi a dosaggio inferiore. Gli animali dell'eventuale gruppo satellite dovranno essere sottoposti ad esame istologico, in particolare per gli organi e i tessuti che risultano colpiti da effetti tossici negli altri gruppi trattati.

2. **DATI**

I risultati dovranno essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo trattato, il numero di animali all'inizio del saggio e il numero di animali che mostra ciascun tipo di lesione.

Tutti i risultati osservati dovranno essere valutati con un adeguato metodo statistico. Può essere utilizzato qualsiasi metodo statistico riconosciuto.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione di prova deve, se possibile, includere le seguenti informazioni:

— dati sugli animali (specie, ceppo, origine, condizioni ambientali, dieta, ecc.);

— condizioni di prova (incluso il tipo di medicazione: occlusiva o non occlusiva);

— livello di dosaggio (incluso il veicolo, se usato) e concentrazioni;

— livello senza effetti, dove possibile;

— effetti tossici per sesso e dosaggio;

— il momento del decesso durante il saggio, oppure se gli animali sono sopravvissuti sino al termine;

— effetti tossici o altri effetti;

— momento dell'osservazione di ciascun sintomo anomalo e suo successivo decorso;

— dati relativi al consumo di alimenti e al peso corporeo;

— esami ematologici effettuati e loro risultati;

▼B

— esami biochimico-clinici effettuati e loro risultati;

— risultati della necroscopia;

— descrizione dettagliata di tutti i risultati istopatologici;

— elaborazione statistica dei risultati, ove possibile;

— discussione dei risultati;

— interpretazione dei risultati.

3.2. VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE

Vedi introduzione generale, parte B (punto D).

4. **BIBLIOGRAFIA**

Vedi introduzione generale, parte B (punto E)

▼M7

B.10. PROVA IN VITRO DI ABERRAZIONE CROMOSOMICA NEI MAMMIFERI

INTRODUZIONE

Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 473 (2016) e fa parte di una serie di metodi di prova sulla tossicologia genetica. È stato elaborato un documento OCSE contenente informazioni succinte sulle prove di tossicologia genetica e un compendio delle modifiche recentemente apportate alla rispettiva linea guida (1).

La prova in vitro di aberrazione cromosomica è destinata ad identificare le sostanze chimiche che causano aberrazioni cromosomiche strutturali in una coltura di cellule di mammifero (2) (3) (4). Le aberrazioni strutturali possono essere di due tipi: cromosomiche o cromatidiche. Nei test di aberrazione cromosomica in vitro può verificarsi poliploidia (compresa l'endoriduplicazione). Se è vero che gli aneugeni possono provocare poliploidia, quest'ultima di per sé non indica un potenziale aneugenico e può semplicemente rivelare una perturbazione del ciclo cellulare o citotossicità (5). Questa prova non è destinata a misurare l'aneuploidia. Per il rilevamento dell'aneuploidia si raccomanda un test del micronucleo in vitro (6).

Nella prova in vitro di aberrazione cromosomica si possono usare colture di linee cellulari stabilizzate o colture cellulari primarie di origine umana o di roditori. Le cellule devono essere scelte in funzione della capacità di crescita in coltura, della stabilità del cariotipo (compreso il numero dei cromosomi) e della frequenza delle aberrazioni cromosomiche spontanee (7). Attualmente i dati disponibili non consentono di elaborare raccomandazioni solide ma rivelano l'importanza di considerare, al momento di valutare i rischi chimici: lo stato della p53, la stabilità genetica (del cariotipo), la capacità di riparazione del DNA e l'origine (da roditori piuttosto che umane) delle cellule scelte per la sperimentazione. Gli utilizzatori del presente metodo di prova sono pertanto incoraggiati a valutare l'influenza di queste ed altre caratteristiche cellulari sul comportamento di una linea cellulare nel rilevare l'induzione di aberrazioni cromosomiche, in funzione dell'evoluzione delle conoscenze in questo campo.

Le definizioni utilizzate figurano nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

Le prove in vitro richiedono in generale l'uso di una fonte esogena di attivazione metabolica, a meno che le cellule non siano metabolicamente compatibili con le sostanze chimiche in esame. Il sistema esogeno di attivazione metabolica non simula perfettamente le condizioni in vivo. Occorre adoperarsi per evitare condizioni che potrebbero portare a falsi risultati positivi, vale a dire danni cromosomici non causati da un'interazione diretta tra le sostanze chimiche in esame e i cromosomi; tali condizioni comprendono le variazioni di pH o di osmolalità (8) (9) (10), l'interazione con gli ingredienti del mezzo (11) (12) o livelli eccessivi di citotossicità (13) (14) (15) (16).

La prova è utilizzata per individuare aberrazioni cromosomiche che possono derivare da eventi clastogenici. L'analisi dell'induzione di aberrazioni cromosomiche deve avvenire utilizzando cellule in metafase. È quindi essenziale che le cellule raggiungano la mitosi sia nelle colture trattate sia in quelle non trattate. Possono essere necessari adattamenti specifici di questo metodo di prova, non descritti in questa sede, per i nanomateriali di sintesi.

Prima dell'uso del metodo di prova su una miscela, per la generazione di dati per un determinato scopo normativo, occorre esaminare se, e in caso affermativo perché, può fornire risultati adeguati a tale scopo. Tali considerazioni non sono necessarie in presenza di un obbligo normativo di prova sulla miscela.

▼M7

PRINCIPIO DELLA PROVA

Le colture di cellule umane o di altro mammifero sono esposte alla sostanza chimica in esame con e senza una fonte esogena di attivazione metabolica, a meno di utilizzare cellule con un'adeguata capacità metabolizzante (cfr. il paragrafo 13). Dopo l'inizio dell'esposizione alla sostanza chimica in esame, le colture cellulari sono trattate, a intervalli opportunamente predefiniti, con un inibitore della metafase (per esempio Colcemid o colchicina), raccolte e sottoposte a un processo di colorazione; le cellule in metafase sono esaminate al microscopio per determinare la presenza di aberrazioni di tipo cromatidico e cromosomiche.

DESCRIZIONE DEL METODO

Preparazioni

Cellule

Si possono utilizzare varie linee cellulari (ad esempio cellule di ovario di criceto cinese (CHO), di polmone di criceto cinese V79, di polmone di criceto cinese (CHL)/IU, TK 6) o colture cellulari primarie, fra cui linfociti del sangue periferico umano o di altri mammiferi (7). La scelta delle linee cellulari deve essere scientificamente motivata. Nel caso di impiego di cellule primarie, per motivi attinenti al benessere degli animali occorre prendere in considerazione l'uso di cellule di origine umana ove possibile, prelevate in conformità dei principi e delle norme etiche pertinenti. I linfociti del sangue periferico umano devono essere ottenuti da soggetti giovani (circa 18-35 anni di età), non fumatori, non affetti da malattie note e non esposti recentemente ad agenti genotossici (ad esempio sostanze chimiche o radiazioni ionizzanti) a livelli tali da aumentare l'incidenza di base di aberrazioni cromosomiche. In tal modo si garantisce che l'incidenza di base di aberrazioni cromosomiche rimanga lieve e omogenea. L'incidenza di base di aberrazioni cromosomiche aumenta con l'età e questa tendenza è più marcata nelle donne che negli uomini (17) (18). Se si raccolgono cellule da più donatori, il numero dei donatori dev'essere indicato. È necessario dimostrare che le cellule si sono divise fra l'inizio del trattamento con la sostanza chimica in esame e il prelievo. Le colture cellulari vengono mantenute in una fase di crescita esponenziale (linee cellulari) o stimolate a dividersi (colture primarie di linfociti), per esporre le cellule in diversi stadi del ciclo cellulare, essendo potenzialmente ignota la sensibilità dei diversi stadi delle cellule alle sostanze chimiche in esame. In generale, le cellule primarie che per dividersi devono essere stimolate con agenti mitogenici non sono più sincronizzate durante l'esposizione alla sostanza chimica in esame (ad esempio linfociti umani dopo 48 ore dalla stimolazione mitogenica). L'uso di cellule sincronizzate durante il trattamento non è raccomandato, ma può essere ammissibile se giustificato.

Mezzo e condizioni di coltura

Le colture vanno mantenute in mezzi di coltura e condizioni di incubazione (recipienti di coltura, atmosfera umidificata al 5 % di CO_2 se del caso, temperatura di incubazione di 37 °C) adeguati. Occorre controllare periodicamente la stabilità del numero modale dei cromosomi e l'assenza di contaminazione da micoplasma nelle linee cellulari (7) (19); non si devono usare cellule contaminate o che presentano modifiche del numero modale dei cromosomi. Occorre stabilire la durata normale del ciclo cellulare delle linee cellulari o delle colture primarie utilizzate nel laboratorio di prova, che deve essere coerente con le caratteristiche cellulari pubblicate (20).

Preparazione delle colture

Linee cellulari: le cellule provenienti da colture primarie vengono inoculate in un terreno di coltura ad una densità tale da consentire alle cellule in sospensione o in monostrati di continuare a crescere in maniera esponenziale fino al momento del prelievo (occorre, ad esempio, evitare che le cellule in crescita in monostrati raggiungano la confluenza).

▼M7

Linfociti: sangue intero trattato con un anticoagulante (ad esempio eparina) o linfociti isolati sono posti in un terreno di coltura (ad esempio per 48 ore nel caso di linfociti umani) contenente un mitogeno [ad esempio fitoemoagglutinina (PHA) nel caso di linfociti umani] per ridurre la divisione cellulare prima dell'esposizione alla sostanza chimica in esame.

Attivazione metabolica

Se si utilizzano cellule prive di un'adeguata capacità di attivazione metabolica endogena si deve ricorrere a sistemi di attivazione metabolica esogeni. Il sistema più comunemente usato, raccomandato in tutti i casi salvo alternativa motivata, è una frazione post-mitocondriale integrata di cofattore (S9), prelevata dal fegato di roditori (solitamente ratti) trattati con induttori enzimatici come Aroclor 1254 (21) (22) (23) o con una combinazione di fenobarbitone e β-naftoflavone (24) (25) (26) (27) (28) (29). Quest'ultima combinazione è conforme alla convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti (30) e ha dimostrato di essere tanto efficace quanto l'Aroclor 1254 nell'indurre ossidasi a funzione mista (24) (25) (26) (28). Solitamente la frazione S9 viene usata a concentrazioni comprese tra 1 % e 2 % (v/v), ma può essere aumentata al 10 % (v/v) nel terreno di coltura finale. Occorre evitare, durante il trattamento, l'impiego di prodotti che riducono il coefficiente mitotico, soprattutto prodotti di complessazione del calcio (31). La scelta del tipo e della concentrazione del sistema di attivazione metabolica esogeno o dell'induttore metabolico utilizzato può essere influenzata dalla classe delle sostanze chimiche in esame.

Preparazione della sostanza chimica in esame

Le sostanze chimiche in esame solide devono essere preparate in adeguati solventi e, se necessario, diluite prima del trattamento delle cellule (cfr. il paragrafo 23). Le sostanze chimiche in esame liquide possono essere aggiunte direttamente alla coltura o diluite prima del trattamento della coltura stessa. Le sostanze chimiche in esame gassose o volatili devono essere sottoposte alla prova modificando adeguatamente i protocolli standard (trattamento in recipienti di coltura ermetici) (33) (34). Occorre preparare la sostanza chimica in esame subito prima del trattamento, salvo se i dati sulla stabilità dimostrano che la conservazione è un'alternativa accettabile.

Condizioni sperimentali

Solventi

La scelta del solvente deve favorire l'ottimizzazione della solubilità delle sostanze chimiche in esame, senza nuocere alla conduzione del saggio (ad esempio influenzando la crescita cellulare), compromettere l'integrità della sostanza chimica in esame, reagire con recipienti di coltura o pregiudicare il sistema di attivazione metabolica. Si raccomanda di prendere in considerazione in primo luogo, se possibile, l'uso di un solvente (o mezzo di coltura) acquoso. Solventi di uso consolidato sono, ad esempio, l'acqua o il dimetilsolfossido. In generale è opportuno che i solventi organici non superino l'1 % (v/v) e quelli acquosi (soluzione fisiologica o acqua) il 10 % (v/v) nel terreno di coltura finale. Qualora si utilizzino solventi di uso non consolidato (ad esempio etanolo o acetone), il loro uso dovrebbe essere suffragato da dati che ne comprovino la compatibilità con le sostanze chimiche in esame e con il sistema di prova e l'assenza di tossicità genetica alla concentrazione usata. In assenza di tali dati, è importante includere controlli non trattati (cfr. l'appendice 1) per dimostrare che il solvente scelto non induce effetti nocivi o clastogenici.

Misurazione della proliferazione cellulare e della citotossicità e scelta delle concentrazioni di trattamento

Nel determinare la concentrazione più elevata della sostanza chimica in esame, occorre evitare le concentrazioni che hanno la capacità di produrre falsi risultati positivi, come quelle che causano eccessiva citotossicità (cfr. il paragrafo 22), precipitazione nel terreno di coltura (cfr. il paragrafo 23) o variazioni marcate del

▼M7

pH o osmolalità (cfr. il paragrafo 5). Se la sostanza chimica in esame provoca una variazione marcata del pH del mezzo al momento dell'aggiunta, il pH può essere adeguato tamponando il terreno di coltura finale in modo da evitare falsi risultati positivi e mantenere adeguate condizioni di coltura.

Occorre misurare la proliferazione cellulare per garantire che un numero sufficiente di cellule trattate abbia raggiunto la mitosi durante la prova e che i trattamenti siano condotti ad adeguati livelli di citotossicità (cfr. i paragrafi 18 e 22). La citotossicità deve essere determinata con e senza attivazione metabolica nel test principale, sulla base di un indicatore adeguato della morte e della crescita cellulare. Mentre la valutazione della citotossicità in un saggio iniziale può essere utile per definire meglio le concentrazioni da utilizzare per il test principale, l'effettuazione di un saggio iniziale non è obbligatoria. Se viene eseguito, non deve sostituire la misurazione della citotossicità nel test principale.

Il raddoppiamento relativo della popolazione (RPD) o l'aumento relativo delle conte cellulari (RICC) sono metodi adeguati per la valutazione della citotossicità nella prova citogenetica (13) (15) (35) (36) (55) (cfr. l'appendice 2 per le formule). In caso di trattamento a lungo termine e fasi di campionamento dopo l'inizio del trattamento superiori a 1,5 volte la durata normale del ciclo cellulare (ossia oltre 3 cicli cellulari in totale), l'RPD potrebbe sottostimare la citotossicità (37). In tali circostanze l'RICC potrebbe essere una misura migliore, ma una stima utile si potrebbe ottenere anche valutando la citotossicità mediante l'RPD dopo 1,5 cicli cellulari normali.

Per i linfociti in colture primarie, il coefficiente mitotico (MI) è una misura degli effetti citotossici/citostatici, ma è anche influenzato dal tempo trascorso fra il trattamento e la misurazione, dal mitogeno usato e dalla possibile interruzione del ciclo cellulare. Tuttavia, il coefficiente mitotico è accettabile perché altre misurazioni della citotossicità potrebbero essere onerose e di difficile esecuzione e potrebbero non risultare adeguate alla popolazione interessata di linfociti in crescita in risposta alla stimolazione con PHA.

Mentre RICC e RPD per le linee cellulari e MI per la coltura primaria di linfociti sono i parametri raccomandati di citotossicità, altri indicatori (ad esempio l'integrità delle cellule, l'apoptosi, la necrosi, il ciclo cellulare) potrebbero fornire utili informazioni aggiuntive.

Occorre valutare almeno tre concentrazioni di prova (non compreso il solvente e i controlli positivi) che soddisfano i criteri di accettabilità (adeguata citotossicità, numero di cellule, ecc.). A prescindere dal tipo di cellula (linee cellulari o colture primarie di linfociti), ciascuna coltura realizzata singolarmente o in più repliche può essere utilizzata per ciascuna concentrazione di prova. È consigliato l'uso di colture in duplicato, ma colture singole sono accettabili a condizione di analizzare lo stesso numero totale di cellule sia nel caso di coltura singola sia nel caso di colture in duplicato. L'uso di colture singole è particolarmente indicato quando si valutano più di 3 concentrazioni (cfr. il paragrafo 31). I risultati ottenuti con colture replicate indipendenti con una determinata concentrazione possono essere aggregati per l'analisi dei dati (38). Per le sostanze chimiche di prova che dimostrino tossicità assente o debole, sono solitamente indicati intervalli di concentrazione di un fattore da 2 a 3. In caso di citotossicità, le concentrazioni selezionate per la prova devono coprire una gamma comprendente quella che ha prodotto la citotossicità di cui al paragrafo 22 e concentrazioni alle quali la citotossicità è debole o assente. Molte sostanze chimiche in esame presentano curve di concentrazione-risposta accentuate e al fine di ottenere dati a bassa o

▼M7

debole citotossicità o di studiare la relazione dose-risposta nel dettaglio, sarà necessario ricorrere a concentrazioni separate fra loro da intervalli minori e/o a più di tre concentrazioni (colture singole o replicate), in particolare nelle situazioni in cui è necessario ripetere l'esperimento (cfr. il paragrafo 47).

Se la concentrazione massima è basata sulla citotossicità, la concentrazione più elevata deve puntare a raggiungere il 55 ± 5 % di citotossicità sulla base dei parametri di citotossicità raccomandati (ossia la riduzione di RICC e RPD per le linee cellulari e la riduzione di MI per le colture primarie di linfociti al 45 ± 5 % nel controllo negativo parallelo). Occorre interpretare con cautela risultati positivi ottenuti nel solo segmento superiore di tale intervallo di citotossicità al 55 ± 5 % (13).

Per le sostanze chimiche scarsamente solubili non citotossiche a concentrazioni inferiori alla concentrazione minima insolubile, la più elevata concentrazione analizzata dovrebbe produrre torbidità o la formazione di un precipitato visibile a occhio nudo o con l'aiuto di un microscopio invertito, alla fine del trattamento con la sostanza chimica di prova. Anche se la citotossicità si verifica a concentrazioni superiori a quella minima insolubile, è indicato effettuare la prova a una sola concentrazione che produce torbidità o un precipitato visibile, perché il precipitato può falsare gli effetti. Alla concentrazione che produce un precipitato, occorre adoperarsi per garantire che il precipitato non interferisca nello svolgimento della prova (ad esempio mediante colorazioni o abrasioni). Può essere utile determinare la solubilità nel terreno di coltura prima del test.

Se non si osserva nessun precipitato o nessuna citotossicità limitante, la concentrazione massima di prova dovrebbe essere pari al valore più basso fra 10 mM, 2 mg/ml o 2 µl/ml (39) (40) (41). Se la sostanza chimica in esame non ha una composizione definita — quale ad esempio una sostanza di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici (UVCB) (42) o estratti dall'ambiente, ecc. — la concentrazione massima potrebbe dover essere più elevata (ad esempio 5 mg/ml), in mancanza di sufficiente citotossicità, per aumentare la concentrazione di ciascuna componente. Va tuttavia rilevato che tali requisiti possono essere diversi per i prodotti farmaceutici per uso umano (43).

Controlli

Occorre anche effettuare controlli negativi paralleli (cfr. il paragrafo 15), con il solo solvente sul terreno di coltura, trattato allo stesso modo delle colture di trattamento, per ogni fase di raccolta.

Controlli positivi paralleli sono necessari per dimostrare la capacità del laboratorio di individuare clastogeni alle condizioni del protocollo di prova utilizzato e l'efficacia del sistema di attivazione metabolica esogeno, se del caso. Esempi di controlli positivi sono indicati nella tabella 1 in appresso. Si possono utilizzare sostanze chimiche alternative di controllo, se giustificate. Poiché test in vitro su cellule di mammiferi per tossicità genetica sono sufficientemente standardizzati, l'uso dei controlli positivi può limitarsi a un clastogeno che richiede attivazione metabolica. A condizione che si svolga contemporaneamente alla prova senza attivazione con la stessa durata di trattamento, quest'unico risultato di controllo positivo dimostrerà sia l'attività del sistema di attivazione metabolica sia la capacità di risposta del sistema di prova. Tuttavia, il trattamento a lungo termine (senza S9) richiede l'effettuazione di un proprio controllo positivo, in quanto la durata del trattamento differisce da quella della prova con attivazione metabolica. Ciascun controllo positivo deve essere utilizzato a una o più concentrazioni da cui ci si attende un aumento riproducibile e rilevabile rispetto ai valori di fondo, per dimostrare la sensibilità del sistema di prova (ossia effetti chiari che tuttavia non rivelino immediatamente allo sperimentatore l'identità dei vetrini codificati), e la risposta non deve essere compromessa da una citotossicità superiore ai limiti specificati nel metodo di prova.

▼M7

Tabella 1.

Sostanze chimiche di riferimento raccomandate per la valutazione della competenza dei laboratori e per la selezione dei controlli positivi.

Categoria	Sostanza chimica	CASRN
1. Clastogeni attivi senza attivazione metabolica		
	Metansolfonato di metile	66-27-3
	Mitomicina C	50-07-7
	4-nitrochinolina-N-ossido	56-57-5
	Citosina arabinoside	147-94-4
2. Clastogeni che richiedono attivazione metabolica		
	Benzo(a)pirene	50-32-8
	Ciclofosfamide	50-18-0

SVOLGIMENTO DEL METODO

Trattamento con la sostanza chimica in esame

Le cellule in proliferazione sono trattate con la sostanza chimica in esame in presenza e in assenza di un sistema di attivazione metabolica.

Raccolta delle colture

Ai fini di una valutazione rigorosa, necessaria per concludere un esito negativo, occorre rispettare tutte e tre le seguenti condizioni sperimentali utilizzando un trattamento di breve durata con e senza attivazione metabolica e un trattamento di lunga durata senza attivazione metabolica (cfr. i paragrafi 43, 44 e 45):

— si espongono le cellule alla sostanza chimica in esame, senza attivazione metabolica, per 3-6 ore e si procede al campionamento quando sia trascorso un periodo equivalente a circa una volta e mezza la durata del ciclo cellulare normale dall'inizio del trattamento (18);

— si espongono le cellule alla sostanza chimica in esame, con attivazione metabolica, per 3-6 ore e si procede al campionamento quando sia trascorso un periodo equivalente a circa una volta e mezza la durata del ciclo cellulare normale dall'inizio del trattamento (18);

— si espongono le cellule in modo continuo senza attivazione metabolica fino al campionamento dopo un periodo equivalente a circa una volta e mezza la durata del ciclo cellulare normale. Alcune sostanze chimiche (ad esempio analoghi di nucleosidi) possono essere individuate più facilmente con tempi di trattamento/campionamento superiori a una volta e mezzo la durata del ciclo cellulare (24).

Nel caso in cui una qualsiasi delle suddette condizioni sperimentali porti ad un risultato positivo, può non essere necessario esaminare gli altri regimi di trattamento.

Preparazione dei cromosomi

Le colture cellulari sono trattate con Colcemid o colchicina, di norma per un periodo variabile da una a tre ore prima della raccolta. Ogni coltura cellulare viene raccolta e trattata separatamente per la preparazione dei cromosomi. La preparazione dei cromosomi comprende il trattamento ipotonico delle cellule, il fissaggio e la colorazione. Nei monostrati possono essere presenti cellule mitotiche (identificabili perché di forma tonda e in fase di distacco dalla superficie) al termine del trattamento di 3-6 ore. Poiché tali cellule mitotiche si staccano facilmente, potrebbero andare perdute al momento della rimozione del terreno di coltura contenente la sostanza chimica in esame. Se si rileva un aumento

▼M7

sostanziale del numero di cellule mitotiche rispetto ai controlli, tale da indicare il probabile arresto mitotico, occorre allora prelevare le cellule mediante centrifugazione e aggiungerle nuovamente alle colture per evitare di perdere cellule in mitosi, e quindi a rischio di aberrazione cromosomica, al momento della raccolta.

Analisi

Tutti i vetrini, compresi quelli dei controlli positivi e negativi, devono essere codificati indipendentemente prima dell'esame al microscopio per l'aberrazione cromosomica. Poiché le procedure di fissaggio provocano spesso la perdita di cromosomi in una parte delle cellule in metafase, le cellule classificate devono contenere un numero di centromeri pari al numero modale ± 2.

Occorre classificare almeno 300 metafasi ben spaziate per ogni concentrazione e per ogni controllo, per rilevare un risultato chiaramente negativo per la sostanza chimica in esame (cfr. il paragrafo 45). Se si usano colture replicate, le 300 cellule devono essere divise equamente tra le repliche. Se si usano colture singole per ogni concentrazione (cfr. il paragrafo 21), occorre classificare almeno 300 metafasi ben spaziate in ogni coltura singola. L'analisi di 300 cellule comporta il vantaggio di aumentare la potenza statistica della prova; inoltre valori pari a zero saranno rari (stimati dell'ordine del 5 %) (44). È possibile ridurre il numero di metafasi classificate se si osserva un numero elevato di cellule con aberrazioni cromosomiche e la sostanza chimica in esame è considerata chiaramente positiva.

Le cellule che presentano una o più aberrazioni cromosomiche strutturali con e senza gap devono essere classificate. Le rotture e i gap sono definiti nell'appendice 1 conformemente a (45) (46). Occorre registrare separatamente le aberrazioni cromatidiche e quelle cromosomiche e classificarle in sottotipi (rotture, scambi). Le procedure in uso presso il laboratorio devono assicurare che l'analisi delle aberrazioni cromosomiche sia effettuata da analisti ben preparati e sottoposta valutazione inter pares, se del caso.

Sebbene la prova sia destinata a rivelare aberrazioni cromosomiche strutturali, è importante registrare le frequenze di eventuali casi di poliploidia e di endoriduplicazione (cfr. il paragrafo 2).

Competenza del laboratorio

Al fine di verificare sufficiente esperienza con la prova prima del suo impiego corrente, il laboratorio deve avere eseguito una serie di esperimenti con sostanze chimiche positive di riferimento che agiscono attraverso meccanismi diversi e vari controlli negativi (con diversi solventi/veicoli). Tali risposte dei controlli, positive e negative, devono essere coerenti con la letteratura scientifica. Ciò non si applica ai laboratori che hanno già maturato un'esperienza, vale a dire che dispongono di una banca di dati storici quale definita al paragrafo 37.

Occorre analizzare una selezione di sostanze chimiche di controllo a esito positivo (cfr. la tabella 1 al paragrafo 26) con trattamenti brevi e lunghi in assenza di attivazione metabolica e anche con trattamento breve in presenza di attivazione metabolica, al fine di dimostrare la capacità di individuare sostanze chimiche con proprietà clastogeniche e determinare l'efficacia del sistema di attivazione metabolica. Occorre scegliere una serie di concentrazioni delle sostanze chimiche selezionate per fornire aumenti riproducibili e correlati alla concentrazione rispetto ai valori di fondo, dimostrando così la sensibilità e la gamma dinamica del sistema di prova.

▼M7

Dati storici di controllo

Il laboratorio deve stabilire:

— gamma e distribuzione dei controlli positivi storici,

— gamma e distribuzione dei controlli negativi storici (non trattati, trattati con solvente).

All'acquisizione dei primi dati di distribuzione dei controlli negativi storici, è necessario che i controlli negativi paralleli siano coerenti con i dati di controllo pubblicati, se esistenti. Con l'aumento dei dati sperimentali aggiunti alla distribuzione dei controlli, i controlli negativi paralleli dovrebbero idealmente situarsi entro i limiti di tale controllo al 95 % di tale distribuzione (44) (47). La banca dati dei controlli negativi storici del laboratorio deve inizialmente essere costituita con un minimo di 10 esperimenti ma preferibilmente con almeno 20 esperimenti svolti in condizioni sperimentali analoghe. I laboratori devono utilizzare metodi di controllo della qualità, quali diagrammi di controllo (ad esempio carte C o carte X medio (48)), per rilevare la variabilità dei loro dati di controllo positivi e negativi e dimostrare che la metodologia è «sotto controllo» nel laboratorio (44). Ulteriori raccomandazioni su come sviluppare e utilizzare i dati storici (cioè i criteri per l'inclusione e l'esclusione di dati nelle serie storiche e i criteri di accettabilità per un determinato esperimento) sono reperibili nella letteratura scientifica (47).

Eventuali modifiche apportate al protocollo sperimentale devono essere considerate in base alla loro coerenza con le esistenti banche dati di controlli storici del laboratorio. L'esistenza di incongruenze significative deve portare alla creazione di una nuova banca dati di controlli storici.

I dati sui controlli negativi devono comprendere l'incidenza di cellule con aberrazioni cromosomiche da coltura singola o dalla somma di colture replicate, come descritto nel paragrafo 21. I controlli negativi paralleli dovrebbero idealmente situarsi entro i limiti di tale controllo al 95 % della distribuzione della banca dati dei controlli negativi storici del laboratorio (44) (47). Qualora i dati dei controlli negativi paralleli non rientrino nei limiti del controllo al 95 %, possono essere accettabili per l'inserimento nella distribuzione dei controlli storici purché non siano valori erratici estremi e sia provato che il sistema di prova è «sotto controllo» (cfr. il paragrafo 37) e che non si sono verificati errori tecnici o umani.

DATI E RELAZIONE

Presentazione dei risultati

Occorre valutare la percentuale di cellule con una o più aberrazioni cromosomiche strutturali. Occorre elencare separatamente le aberrazioni cromosomiche e quelle cromatidiche e classificarle in sottotipi (rotture, scambi) con l'indicazione del numero e della frequenza per le colture sperimentali e di controllo. I gap devono essere registrati e indicati separatamente nella relazione, ma non inclusi nella frequenza totale delle aberrazioni. Le percentuali di poliploidia e/o di cellule endoriduplicate sono segnalate se verificate.

Occorre riportare anche le misurazioni di citotossicità condotte in parallelo per tutte le colture trattate di controllo negativo e positivo nei principali test di aberrazione.

Occorre fornire dati sulle singole colture. Tutti i dati devono essere riassunti in tabelle.

Criteri di accettabilità

L'accettazione di una prova è basata sui seguenti criteri:

— il controllo negativo parallelo è considerato accettabile per inserimento nella banca dati sui controlli negativi storici di laboratorio come descritto al paragrafo 39.

▼M7

— I controlli positivi paralleli (cfr. il paragrafo 26) devono indurre risposte compatibili con quelle generate nella banca dati dei controlli positivi storici e produrre un aumento statisticamente significativo rispetto al controllo negativo parallelo.

— Devono essere soddisfatti i criteri di proliferazione cellulare nel controllo con solvente (paragrafi 17 e 18).

— Tutte e tre le condizioni sperimentali sono state testate a meno che una abbia portato a risultati positivi (cfr. il paragrafo 28).

— Un adeguato numero di cellule e concentrazioni è analizzabile (paragrafi 31 e 21).

— I criteri di selezione della concentrazione massima sono conformi a quelli descritti ai paragrafi 22, 23 e 24.

Analisi e interpretazione dei risultati

A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è considerata chiaramente positiva se, in una qualsiasi delle condizioni sperimentali esaminate (cfr. il paragrafo 28):

a) almeno una delle concentrazioni di prova presenta un aumento statisticamente significativo rispetto al controllo negativo parallelo;

b) l'aumento è correlato alla dose somministrata se valutato con un'adeguata analisi della tendenza;

c) vi sono risultati che non rientrano nella distribuzione dei dati dei controlli negativi storici (ad esempio limiti di controllo al 95 % di una distribuzione di Poisson; cfr. il paragrafo 39).

Se tutti i criteri sono soddisfatti, la sostanza chimica in esame è ritenuta in grado di indurre aberrazioni cromosomiche in cellule di mammifero coltivate nel sistema di prova. Raccomandazioni dei metodi statistici più appropriati sono reperibili nella letteratura scientifica (49) (50) (51).

A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è considerata chiaramente negativa se, in tutte le condizioni sperimentali esaminate (cfr. il paragrafo 28):

a) nessuna concentrazione di prova presenta un aumento statisticamente significativo rispetto al controllo negativo parallelo;

b) non si verifica nessun aumento correlato alla dose somministrata se valutato con un'adeguata analisi della tendenza;

c) tutti i risultati rientrano nella distribuzione dei dati dei controlli negativi storici (ad esempio limiti di controllo al 95 % di una distribuzione di Poisson; cfr. il paragrafo 39).

La sostanza chimica in esame è quindi ritenuta non in grado di indurre aberrazioni cromosomiche in cellule di mammifero coltivate nel sistema di prova.

Non è necessario verificare una risposta palesemente positiva o negativa.

In caso di risposta non chiaramente positiva o negativa come sopra descritto o per contribuire a stabilire la pertinenza biologica di un risultato, i dati devono essere valutati da esperti e/o mediante ulteriori indagini. Potrebbe essere utile analizzare nuove cellule (se appropriato) o ripetere un esperimento modificandone eventualmente le condizioni (ad esempio, intervallazione delle concentrazioni, altre condizioni di attivazione metabolica (ossia concentrazione S9 od origine S9)).

In rari casi, anche dopo ulteriori indagini, i dati non consentono di arrivare a una conclusione positiva o negativa e pertanto la risposta della sostanza chimica in esame è considerata ambigua.

▼M7

Un aumento del numero di cellule poliploidi può significare che le sostanze chimiche in esame sono in grado di inibire processi mitotici e di indurre aberrazioni numeriche nei cromosomi (52). Un aumento del numero di cellule con cromosomi endoriduplicati può indicare che le sostanze chimiche in esame sono in grado di inibire la progressione del ciclo cellulare (53) (54) (cfr. il paragrafo 2). Pertanto, l'incidenza delle cellule poliploidi e quella delle cellule con cromosomi endoriduplicati devono essere registrate separatamente.

Relazione sulla prova

La relazione sulla prova deve comprendere le informazioni seguenti.

Sostanza chimica in esame:

— origine, numero di lotto, data limite per l'uso, se disponibili;

— stabilità della sostanza chimica in esame, se nota;

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente, se note;

— misurazione del pH, dell'osmolalità e del precipitato nel terreno di coltura a cui è stata aggiunta la sostanza chimica in esame, se del caso.

Sostanza mono-componente:

— aspetto fisico, solubilità in acqua e altre proprietà fisico-chimiche pertinenti;

— identificazione chimica, quale nome IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale, purezza, identità chimica di eventuali impurità se opportuno e fattibile, ecc.

Sostanza multi-componente, UVCB e miscele:

— caratterizzarne, per quanto possibile, l'identità chimica (cfr. sopra), le proporzioni quantitative e le pertinenti proprietà fisico-chimiche dei componenti.

Solvente:

— motivazione della scelta del solvente;

— si dovrebbe indicare anche la percentuale di solvente nel terreno di coltura.

Cellule:

— tipo e origine delle cellule;

— caratteristiche del cariotipo e idoneità del tipo di cellula usato;

— assenza di micoplasma, per le linee cellulari;

— per le linee cellulari, informazioni sulla durata del ciclo cellulare, sui tempi di raddoppiamento o sull'indice di proliferazione;

— sesso dei donatori di sangue, età e pertinenti informazioni sul donatore, sangue intero o linfociti isolati, mitogeno usato;

— numero di passaggi, se disponibile, per le linee cellulari;

— metodi usati per la conservazione delle colture cellulari, per le linee cellulari;

— numero modale di cromosomi, per le linee cellulari.

▼M7

Condizioni della prova:

— natura e concentrazione dell'inibitore della metafase, durata di esposizione delle cellule;

— concentrazione della sostanza chimica in esame espressa come concentrazione finale nel terreno di coltura (ad esempio µg o mg/ml o mM del terreno di coltura);

— criteri di selezione delle concentrazioni e del numero di colture: per esempio i dati relativi alla citotossicità e ai limiti di solubilità;

— composizione dei terreni di coltura, concentrazione di CO_2 se del caso, livello di umidità;

— concentrazione (e/o volume) del solvente e della sostanza chimica in esame aggiunti nel terreno di coltura;

— temperatura di incubazione;

— tempo di incubazione;

— durata del trattamento;

— momento della raccolta dopo il trattamento;

— densità delle cellule al momento dell'inoculazione, se del caso;

— tipo e composizione del sistema di attivazione metabolica (fonte di S9, metodo di preparazione della miscela S9, concentrazione o volume della miscela S9 e di S9 nel terreno di coltura, controlli di qualità S9);

— sostanze di controllo positive e negative, concentrazioni finali per ciascuna delle condizioni di trattamento;

— metodi di preparazione dei vetrini e tecniche di colorazione utilizzati;

— criteri di accettabilità dei saggi;

— criteri di classificazione dei vetrini;

— numero di metafasi analizzate;

— metodi di misurazione della citotossicità;

— eventuali informazioni supplementari pertinenti per la citotossicità e metodo usato;

— criteri in base ai quali i risultati sono considerati positivi, negativi o ambigui;

— metodi utilizzati per determinare pH, osmolalità e precipitazione.

Risultati:

— numero di cellule trattate e numero di cellule raccolte per ciascuna coltura se sono utilizzate linee cellulari;

— misurazioni della citotossicità, ad esempio RPD, RICC, MI, altre osservazioni se del caso;

— informazioni sulla durata del ciclo cellulare, sui tempi di raddoppiamento o sull'indice di proliferazione in caso di linee cellulari;

— segni di precipitazione e momento della determinazione;

▼M7

— definizione delle aberrazioni, compresi i gap;

— numero di cellule classificate, numero di cellule con aberrazioni cromosomiche e tipi di aberrazioni cromosomiche indicati separatamente per ciascuna coltura trattata e di controllo, con e senza gaps;

— eventuali cambiamenti di ploidia (cellule poliploidi e cellule con cromosomi endoriduplicati, indicate separatamente);

— relazione concentrazione-risposta, se possibile;

— dati sui controlli paralleli negativi (solvente) e positivi (concentrazioni e solventi);

— dati sui controlli storici negativi (solvente) e positivi, con intervalli, medie e deviazioni standard e limiti di controllo al 95 % della distribuzione, nonché il numero dei dati;

— analisi statistiche; valori p, se noti.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

BIBLIOGRAFIA

(1) OCSE (2016), Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-15. ENV Publications, Series on Testing and Assessment, n. 234, OCSE, Parigi.

(2) Evans, H.J. (1976), «Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens», in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York and London, pagg. 1-29

(3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), «The in vitro Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture» in *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. *et al*. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York- Oxford, pagg. 427-432.

(4) Galloway, S.M. *et al*. (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pagg. 1-175.

(5) Muehlbauer, P.A. *et al*. (2008), «Improving dose selection and identification of aneugens in the in vitro chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, pagg. 318-327».

(6) Capitolo B.49 del presente allegato, *Test del micronucleo in vitro con cellule di mammifero.*

(7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.

(8) Scott, D. *et al*. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, pagg. 147-204.

(9) Morita, T. *et al*. (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, pagg. 297-305.

(10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagen*esis, Vol. 8/6, pagg. 789-886.

▼M7

(11) Long, L.H. *et al*. (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* Vol. 634/1-2, pagg. 177-183.

(12) Nesslany, F. *et al*. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, pagg. 439-452.

(13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations in vitro: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pagg. 191-201.

(14) Kirkland, D. *et al*. (2005), Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, pagg. 1–256.

(15) Greenwood, S. *et al*. (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the in vitro assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, pagg. 36–44.

(16) Hilliard, C.A. *et al*. (1998), Chromosome aberrations in vitro related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, pagg. 316–326.

(17) Hedner K. *et al*. (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, pagg. 305-309.

(18) Ramsey M.J. *et al*. (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, pagg. 95-106.

(19) Coecke S. *et al*. (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, pagg. 261-287.

(20) Henderson, L. *et al*. (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol. 12/3, pagg. 163-167.

(21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, pagg. 347-363.

(22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, pagg. 173-215.

(23) Natarajan, A.T. *et al*. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res*earch, Vol. 37/1, pagg. 83-90.

(24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix in vitro, *Mutation Research/ Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, pagg. 277-290.

(25) Ong, T.-m. *et al*. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, pagg. 55-65.

(26) Elliot, B.M. *et al*. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in vitro Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, pagg. 175-177.

▼M7

(27) Matsushima, T. *et al*. (1976), «A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems», in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al*. (eds.), Elsevier, North-Holland, pagg. 85-88.

(28) Galloway, S.M. *et al*. (1994). Report from Working Group on in vitro Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pagg. 241-261.

(29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28/1, pagg. 51-59.

(30) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Available at: http://www.pops.int/.

(31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, pagg. 225-8.

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

(33) Zamora, P.O. *et al*. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, pagg. 795-801.

(34) Asakura, M. *et al*. (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, pagg. 122-130.

(35) Lorge, E. *et al*. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the in vitro micronucleus test. I. Theoretical aspects, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 655/1-2, pagg. 1-3.

(36) Galloway, S. *et al*. (2011), Workshop summary: Top concentration for in vitro mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for in vitro cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pagg. 77-83.

(37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in in vitro chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1-2, pagg. 86-87.

(38) Richardson, C. *et al*. (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pagg. 141-154.

(39) OCSE (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the in vitro mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Disponibile su richiesta.

(40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the in vitro chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, pagg. 32-56.

(41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis,* Vol. 54/1, pagg. 36-43.

▼**M7**

(42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Available at: https://federalregister.gov/a/2012-13774.

(44) OCSE (2014), «Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris».

(45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.

(46) Scott, D. *et al*. (1990), «Metaphase chromosome aberration assays in vitro», in *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pagg. 62-86.

(47) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pagg. 87-90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.

(49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.

(50) Galloway, S.M. *et al*. (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pagg. 1-175.

(51) Richardson, C. *et al*. (1989), «Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays», in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pagg. 141-154.

(52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two in vitro mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, Vol. 287/1, pagg. 29-46.

(53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, Vol. 119/3, pagg. 403-413.

(54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin — induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Vol. 43/3, pagg. 1362-1364.

(55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in in vitro chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Res*earch, Vol. 312, pagg. 139-149.

▼M7

Appendice 1

DEFINIZIONI

Aneuploidia: qualsiasi deviazione dal normale numero diploide (o aploide) di cromosomi da parte di uno o più cromosomi, ma non dell'intero corredo di cromosomi (poliploidia).

Apoptosi: morte cellulare programmata caratterizzata da una serie di fasi che portano alla disintegrazione delle cellule in particelle legate alla membrana, le quali vengono poi eliminate mediante fagocitosi o «shedding» (clivaggio dei ricettori di membrana).

Proliferazione cellulare: aumento del numero di cellule dovuto alla divisione mitotica delle cellule.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Rottura cromatidica: discontinuità di un singolo cromatidio in cui vi è un'evidente disallineamento di uno dei cromatidi.

Gap cromatidico: regione non colorata (lesione acromatica) di un singolo cromatidio in cui vi è un disallineamento minimo del cromatidio.

Aberrazione di tipo cromatidico: alterazione cromosomica strutturale che si manifesta nella rottura di un singolo cromatidio o nella rottura e ricongiunzione di cromatidi.

Aberrazione di tipo cromosomico: alterazione cromosomica strutturale che si manifesta nella rottura, o nella rottura e ricongiunzione, di entrambi i cromatidi in uno stesso punto.

Clastogeno: qualsiasi sostanza chimica che causa aberrazioni cromosomiche strutturali in popolazioni di cellule o organismi eucarioti.

Concentrazioni: si riferiscono alle concentrazioni finali della sostanza chimica in esame nel mezzo di coltura.

Citotossicità: per i saggi di cui al presente metodo di prova con linee cellulari, la citotossicità corrisponde a una riduzione del raddoppiamento relativo della popolazione (RPD) o dell'aumento relativo del numero di cellule (RICC) delle cellule trattate rispetto al controllo negativo (cfr. il paragrafo 17 e l'appendice 2). per i saggi di cui al presente metodo di prova con colture primarie di linfociti, la citotossicità corrisponde a una riduzione del coefficiente mitotico (MI) delle cellule trattate rispetto al controllo negativo (cfr. il paragrafo 18 e l'appendice 2).

Endoriduplicazione: processo nel quale, dopo una fase S di replicazione del DNA, il nucleo non inizia la mitosi ma inizia una nuova fase S. Ne risultano cromosomi con 4, 8, 16,… cromatidi.

Genotossico: termine generico che comprende tutti i tipi di danno a carico del DNA o dei cromosomi, tra cui rotture, delezioni, modifiche e collegamenti di nucleotidi, riarrangiamenti, mutazioni geniche, aberrazioni cromosomiche e aneuploidia. Non tutti i tipi di effetti genotossici determinano alterazioni cromosomiche o danni permanenti ai cromosomi.

Coefficiente mitotico (MI): numero delle cellule in metafase diviso per il numero totale di cellule della popolazione: costituisce un'indicazione del grado di proliferazione della popolazione cellulare.

Mitosi: divisione del nucleo cellulare, solitamente suddivisa in profase, prometafase, metafase, anafase e telofase.

Mutageno: un fattore in grado di provocare mutazioni ereditarie delle sequenze di coppie di basi del DNA nei geni o della struttura dei cromosomi (aberrazioni cromosomica).

▼M7

Aberrazione numerica: variazione del numero di cromosomi rispetto al numero diploide caratteristico della specie.

Poliploidia: aberrazioni numeriche dei cromosomi che interessa l'intero corredo cromosomico di cellule o organismi, a differenza dall'aneuploidia, che invece interessa un solo cromosoma o più cromosomi, ma non l'intero corredo cromosomico.

Stato della p53: la proteina p53 partecipa alla regolazione del ciclo cellulare, all'apoptosi e alla riparazione del DNA. Le cellule carenti di proteine p53 funzionali, che non sono in grado di arrestare il ciclo cellulare o di eliminare cellule danneggiate tramite apoptosi o altri meccanismi (ad esempio induzione di riparazione del DNA) relativi alle funzioni della p53 in risposta ad alterazioni del DNA, dovrebbero essere teoricamente più soggette a mutazioni geniche o aberrazioni cromosomiche.

Aumento relativo delle conte cellulari (RICC): aumento del numero di cellule nelle colture esposte ad agenti chimici rispetto all'aumento nelle colture non trattate; il rapporto è espresso in percentuale.

Raddoppiamento relativo della popolazione (*Relative Population Doubling*, RPD): aumento del numero di raddoppiamenti della popolazione nelle colture esposte ad agenti chimici rispetto all'aumento nelle colture non trattate; il rapporto è espresso in percentuale.

Frazione S9 del fegato: supernatante di omogenato epatico centrifugato a 9 000 g, cioè estratto di fegato crudo.

Miscela S9: miscela di frazione S9 del fegato con cofattori necessari per l'attività degli enzimi metabolici.

Controllo con solvente: termine generico che designa le colture di controllo che ricevono unicamente il solvente utilizzato per disciogliere la sostanza chimica in esame.

Aberrazione strutturale: alterazione della struttura cromosomica visibile all'esame microscopico dello stadio di metafase, che si presenta con perdita di segmenti e riordinamenti intercromosomici e intracromosomici.

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

Controllo non trattato: colture non sottoposte a trattamento (che non ricevono alcuna sostanza chimica in esame né solvente) ma preparate in parallelo e in modo identico alle culture esposte alla sostanza chimica in esame.

▼M7

Appendice 2

FORMULE PER LA VALUTAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ

Coefficiente mitotico (MI):

$$\mathbf{MI}(\%) = \frac{\text{Numero di cellule mitotiche}}{\text{Numero di cellule mitotiche}} \times 100$$

si raccomanda di avvalersi dell'**aumento relativo delle conte cellulari (RICC)** o del **raddoppiamento relativo della popolazione (RPD)**, poiché entrambi i metodi tengono conto della proporzione di popolazione cellulare che è andata incontro a divisione.

$$\mathbf{RICC}(\%) = \frac{(\text{Aumento del numero di cellule nelle colture trattate}(\text{finale} - \text{iniziale}))}{(\text{Aumento del numero di cellule nelle colture di controllo}(\text{finale} - \text{iniziale}))} \times 100$$

$$\mathbf{RPD}(\%) = \frac{(\text{Num.di raddoppiamenti della popolazione nelle colture trattate})}{(\text{Num.di raddoppiamenti della popolazione nelle colture trattate})} \times 100$$

dove:

Raddoppiamento della popolazione = [logaritmo (numero di cellule dopo il trattamento ÷ numero di cellule iniziale)] ÷ logaritmo 2

Ad esempio, un RICC o un RPD del 53 % indica una citotossicità/citostasi del 47 % e una citotossicità/citostasi del 55 % misurato con MI significa che il MI reale rappresenta il 45 % del controllo.

In ogni caso, occorre misurare il numero di cellule prima del trattamento, che deve essere identico per le colture trattate e per i controlli negativi.

L'RCC (ossia il rapporto fra il numero di cellule nelle colture trattate e il numero di cellule nelle colture di controllo) è stato usato come parametro di citotossicità in passato, ma oggi non è più raccomandato perché può sottovalutare la citotossicità.

Nelle colture di controllo negativo, il raddoppiamento della popolazione deve essere compatibile con l'esigenza di campionare le cellule dopo il trattamento, trascorso un lasso di tempo pari a circa 1,5 volte la durata del ciclo cellulare normale, e il coefficiente mitotico deve essere sufficientemente elevato per ottenere un numero adeguato di cellule in mitosi e calcolare attendibilmente una riduzione del 50 %.

▼M7

B.11. PROVA DI ABERRAZIONE CROMOSOMICA DEL MIDOLLO OSSEO NEI MAMMIFERI

INTRODUZIONE

Il presente metodo di prova è equivalente alle linee guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 475 (2016), e fa parte di una serie di metodi di prova di tossicologia genetica. È stato elaborato un documento OCSE contenente informazioni succinte sulle prove di tossicologia genetica e un compendio delle modifiche recentemente apportate alla rispettiva linea guida (1).

La prova in vivo di aberrazione cromosomica del midollo osseo nei mammiferi è particolarmente rilevante per valutare la genotossicità. Difatti, benché possano variare a seconda delle specie, i fattori del metabolismo in vivo, gli aspetti farmacocinetici e i processi di riparazione del DNA sono attivi e contribuiscono alle reazioni. La prova in vivo è inoltre utile per studiare più approfonditamente la genotossicità rilevata tramite un sistema in vitro.

La prova in vivo di aberrazione cromosomica del midollo osseo nei mammiferi è utilizzato per individuare aberrazioni cromosomiche strutturali indotte dalle sostanze chimiche in esame nelle cellule del midollo osseo di animali, di solito roditori (2) (3) (4) (5). Tali aberrazioni strutturali possono essere di due tipi: cromosomiche o cromatidiche. La maggior parte delle aberrazioni indotte da sostanze chimiche genotossiche è di tipo cromatidico, ma si verificano anche aberrazioni di tipo cromosomico. I danni cromosomici e i fenomeni ad esse connessi sono la causa di molte malattie genetiche umane e vi sono prove concrete del fatto che, quando causano alterazioni degli oncogeni e dei geni soppressori dei tumori, queste lesioni ed i fenomeni ad esse connessi sono implicati nella comparsa delle neoplasie umane e di quelle sperimentalmente indotte negli animali da laboratorio. Nelle prove di aberrazione cromosomica in vivo possono verificarsi casi di poliploidia (inclusa l'endoriduplicazione). Un aumento della poliploidia non è tuttavia, di per sé, un segno di potenziale aneugenico, e può semplicemente indicare una perturbazione del ciclo delle cellule o citotossicità. Questo test non è destinato a misurare l'aneuploidia, per il cui rilevamento sono raccomandati i test in vivo sui micronuclei negli eritrociti di mammifero (capitolo B.12 del presente allegato) o i test del micronucleo in vitro con cellule di mammifero (capitolo B.49 del presente allegato).

Le definizioni della terminologia usata figurano nell'Appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

Per tale saggio si usano di norma roditori, ma in certi casi si può ricorrere anche ad altre specie se ciò è giustificato sul piano scientifico. Il midollo osseo è il tessuto bersaglio, in quanto è altamente vascolarizzato e contiene una popolazione di cellule a ciclo rapido, che possono essere agevolmente isolate e trattate. L'utilizzazione di specie diverse dai ratti e dai topi deve essere scientificamente giustificata nella relazione. Se si ricorre a specie diverse dai roditori, viene raccomandato di integrare la misurazione delle aberrazioni cromosomiche del midollo osseo in un'altra prova di tossicità pertinente.

Se è comprovato che la sostanza o le sostanze chimiche in esame, o i loro metaboliti, non raggiungono il tessuto bersaglio, può non essere opportuno utilizzare questa prova.

Prima dell'uso del metodo di prova su una miscela, per la generazione di dati per un determinato scopo normativo, occorre esaminare se, e in caso affermativo perché, può fornire risultati adeguati a tale scopo. Tali considerazioni non sono necessarie in presenza di un obbligo normativo di prova sulla miscela.

▼M7

PRINCIPIO DELLA PROVA

Gli animali sono esposti alla sostanza chimica in esame attraverso un'adeguata via d'esposizione, e al momento opportuno, dopo il trattamento, sono soppressi in modo incruento. Prima della soppressione incruenta, gli animali sono trattati con un inibitore della metafase (ad es. colchicina o colcemid). Le preparazioni cromosomiche approntate dalle cellule di midollo osseo sono poi sottoposte a un processo di colorazione, e le cellule in metafase sono analizzate per individuare aberrazioni cromosomiche.

VERIFICA DELLA COMPETENZA DEL LABORATORIO

Prove di competenza

Per accertare che il laboratorio possieda un'esperienza sufficiente nella conduzione del saggio prima di utilizzarlo nelle prove di routine, il laboratorio deve dimostrare la capacità di riprodurre i risultati attesi dai dati pubblicati (ad es. (6)) riguardanti le frequenze delle aberrazioni cromosomiche, con un minimo di due sostanze per i controlli positivi (incluse le risposte deboli indotte da dosi basse di sostanze per i controlli positivi), come quelle elencate nella tabella 1, e con controlli sui mezzi disperdenti/solventi compatibili (cfr. il paragrafo 22). Le dosi utilizzate nel corso di tali sperimentazioni devono produrre aumenti riproducibili e collegati alle dosi somministrate, e devono dimostrare la sensibilità e l'intervallo dinamico del sistema di analisi sul tessuto in questione (il midollo osseo). Il metodo di conteggio deve essere quello che sarà usato dal laboratorio. Questo requisito non si applica ai laboratori con esperienza, che dispongono cioè di una base di dati storica quale definita ai paragrafi 10-14.

Dati di controllo storici

Nell'ambito delle prove di competenza il laboratorio deve stabilire:

— gamma e distribuzione dei controlli positivi storici, e

— gamma e distribuzione dei controlli negativi storici.

All'acquisizione dei primi dati di distribuzione dei controlli negativi storici, è necessario che i controlli negativi paralleli siano coerenti con i dati di controllo pubblicati, se esistenti. Con l'aumento dei dati sperimentali aggiunti alla distribuzione dei controlli storici, i controlli negativi paralleli dovrebbero idealmente situarsi entro i limiti di tale controllo al 95 % di tale distribuzione. La banca dati dei controlli negativi storici del laboratorio deve essere solida sotto il profilo statistico per garantire la capacità del laboratorio di valutare la distribuzione dei suoi dati di controllo negativi. La letteratura suggerisce che possa essere necessario un minimo di 10 esperimenti, ma che sarebbe preferibile contarne almeno 20, svolti in analoghe condizioni sperimentali. I laboratori devono utilizzare metodi di controllo della qualità, quali diagrammi di controllo (ad esempio carte C o carte X medio (7)), per rivelare la variabilità dei loro dati e dimostrare che la metodologia è «sotto controllo» nel laboratorio. Ulteriori raccomandazioni su come sviluppare e utilizzare i dati storici (cioè i criteri per l'inclusione e l'esclusione di dati nelle serie storiche e i criteri di accettabilità per un determinato esperimento) sono reperibili nella letteratura scientifica (8).

Se nell'ambito delle prove di competenza (descritte al paragrafo 9) il laboratorio non porta a termine un numero sufficiente di esperimenti per stabilire una distribuzione dei controlli negativi statisticamente solida (cfr. il paragrafo 11), si può accettare che la distribuzione sia definita durante i primi test di routine. Questo approccio deve seguire le raccomandazioni formulate nella letteratura (8), e i risultati dei controlli negativi ottenuti in questi esperimenti devono essere coerenti con i dati di controllo negativi pubblicati.

▼M7

Eventuali modifiche apportate al protocollo sperimentale devono essere considerate in base alle loro ripercussioni sulla coerenza fra i nuovi dati e le esistenti banche dati di controlli storici del laboratorio. Solo le incongruenze significative dovrebbero portare alla creazione di una nuova banca dati di controlli storici, se il parere di un esperto stabilisce che vi è una differenza rispetto alla distribuzione precedente (cfr. il paragrafo 11). Durante la costituzione di questa nuova banca dati, il laboratorio non ha necessariamente bisogno di una banca dati completa di controlli negativi per permettere lo svolgimento di una prova, a condizione che esso possa dimostrare che i valori dei controlli negativi paralleli rimangano coerenti con la precedente banca dati o con i dati corrispondenti pubblicati.

I dati sui controlli negativi devono riguardare l'incidenza delle aberrazioni cromosomiche strutturali (senza «gap») in ogni animale. I controlli negativi paralleli dovrebbero idealmente situarsi entro i limiti di tale controllo al 95 % della distribuzione della banca dati dei controlli negativi storici del laboratorio. Qualora i dati dei controlli negativi paralleli non rientrino nei limiti del controllo al 95 % possono essere accettabili per l'inserimento nella distribuzione dei controlli storici purché non siano *outlier* estremi e sia provato che il sistema di prova è «sotto controllo» (cfr. il paragrafo 11) e che non si sono verificati errori tecnici o umani.

DESCRIZIONE DEL METODO

Preparazioni

Selezione delle specie animali

Di preferenza sono utilizzati individui adulti, giovani e in buona salute, provenienti da ceppi di animali da laboratorio. Sono comunemente usati i ratti, ma possono essere idonei anche i topi. Si può ricorrere a qualsiasi altra specie idonea di mammiferi, se ciò viene giustificato scientificamente nella relazione.

Condizioni di stabulazione e alimentazione degli animali

Per i roditori, la temperatura dello stabulario deve essere mantenuta a 22 °C (± 3 °C). Idealmente l'umidità relativa deve essere del 50-60 %. Deve comunque essere come minino del 40 % e non deve preferibilmente superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità. Per l'alimentazione, attenersi alle diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata di acqua potabile. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di garantire un'adeguata miscela della sostanza in esame, se somministrata per questa via. Se non ci si aspetta alcun comportamento aggressivo, i roditori vanno alloggiati in piccoli gruppi (non più di cinque in ogni gabbia) dello stesso sesso e gruppo di trattamento, preferibilmente in gabbie a fondo pieno con adeguato arricchimento ambientale. Gli animali possono essere alloggiati individualmente solo se ciò è giustificato sotto il profilo scientifico.

Preparazione degli animali

Sono generalmente utilizzati animali adulti, giovani e sani (i roditori hanno idealmente un'età di 6-10 settimane all'inizio del trattamento, ma sono accettati anche animali di età un pÓ più avanzata), che vengono suddivisi a caso in gruppi di controllo e di trattamento. I singoli animali sono identificati univocamente applicando un metodo incruento e il meno possibile invasivo (cioè inanellamento, etichettatura, applicazione di un microchip o identificazione biometrica, evitando il taglio delle orecchie o la falangectomia) e devono essere acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Deve essere evitata ogni contaminazione incrociata fra il controllo positivo e la sostanza chimica in esame. All'inizio dello studio la variazione di peso degli animali deve essere minima e non superare il ± 20 % del peso medio per ciascun sesso.

Preparazione delle dosi

Le sostanze solide in esame vanno sciolte o poste in sospensione in appropriati solventi o mezzi disperdenti o mescolate alla dieta o all'acqua da bere prima di essere somministrate agli animali. Le sostanze liquide possono essere somministrate direttamente o diluite prima del trattamento. In caso di esposizione per via

▼M7

inalatoria, le sostanze possono essere somministrate sotto forma di gas, vapore o aerosol solido o liquido, in funzione delle loro proprietà fisico-chimiche. Vanno usati preparati freschi della sostanza, a meno che i dati sulla stabilità dimostrino che la conservazione è accettabile e definiscano le adeguate condizioni di conservazione.

Solvente/mezzo disperdente

Il solvente/mezzo disperdente non deve produrre effetti tossici ai livelli di dose usati e non deve reagire chimicamente con la sostanza in esame. L'uso di solventi/mezzi disperdenti poco noti è ammesso solo se suffragato da dati che ne provino la compatibilità. Si raccomanda di prendere in primo luogo in considerazione, se possibile, l'uso di un solvente/mezzo disperdente acquoso. Fra gli esempi di solventi/mezzi disperdenti compatibili e comunemente usati si possono menzionare l'acqua, la soluzione fisiologica, la soluzione di metilcellulosa, la soluzione di carbossimetilcellulosa sodica, l'olio di oliva e l'olio di mais. In mancanza di dati di controllo storici o pubblicati che dimostrino che un solvente/mezzo disperdente atipico prescelto non induce aberrazioni strutturali o altri effetti nocivi, va effettuato uno studio iniziale per stabilire l'accettabilità del controllo del solvente/mezzo disperdente.

Controlli

Controlli positivi

Ogni prova deve generalmente includere un gruppo di animali trattati con una sostanza usata per i controlli positivi. Questa condizione può essere eliminata quando il laboratorio di prova ha dimostrato la sua competenza nello svolgimento della prova e ha stabilito l'intervallo dei controlli positivi storici. Quando manca un gruppo di controllo positivo parallelo, in ogni esperimento devono essere inclusi controlli del conteggio (vetrini fissati e non colorati). Questo può avvenire includendo nello studio campioni di riferimento idonei ottenuti e conservati in occasione di un esperimento separato di controllo positivo svolto periodicamente (ad es. ogni 6-18 mesi) nel laboratorio in cui è condotta la prova; ad esempio, durante la verifica della competenze e successivamente, se necessario, su base periodica.

Le sostanze chimiche per i controlli positivi devono portare, in modo affidabile, a un aumento individuabile della frequenza delle cellule con aberrazioni cromosomiche strutturali al di là del livello spontaneo. Le dosi dei controlli positivi devono essere scelte in modo che gli effetti siano chiari ma non rivelino immediatamente all'analista l'identità dei campioni codificati. È ammissibile che le sostanze per i controlli positivi siano somministrate per una via diversa da quella della sostanza chimica in esame, usando un programma di trattamento diverso, e che il campionamento avvenga in un unico momento. È anche ammissibile, se appropriato, l'uso per i controlli positivi di sostanze di una classe chimica correlata. Nella tabella 1 figurano esempi di sostanze chimiche per i controlli positivi.

Tabella 1.

Esempi di sostanze chimiche per i controlli positivi

Sostanza chimica	CASRN
Metansolfonato di etile	62-50-0
Metansolfonato di metile	66-27-3
Etilnitrosourea	759-73-9
Mitomicina C	50-07-7
Ciclofosfamide (monoidrato)	50-18-0 (6055-19-2)
Trietilenmelammina	51-18-3

▼M7

Controlli negativi

In ogni momento del campionamento devono essere inclusi animali del gruppo di controllo negativo, che sono gestiti nello stesso modo dei gruppi di trattamento, ma a cui non viene somministrata la sostanza chimica in esame. Se per la somministrazione della sostanza in esame si usa un solvente/mezzo disperdente, anche il gruppo di controllo deve riceverlo. Tuttavia, se dai dati dei controlli negativi storici risulta una variabilità intraspecifica e una frequenza delle cellule con aberrazioni strutturali coerente ad ogni momento del campionamento per il laboratorio di prova, può essere sufficiente un solo campionamento per il controllo negativo. In tal caso, esso deve avvenire al momento del primo campionamento effettuato nell'ambito dello studio.

PROCEDURA

Numero e sesso degli animali

In generale, la risposta dei micronuclei è simile nei maschi e nelle femmine degli animali (9), ed è da prevedere che ciò valga anche per le aberrazioni cromosomiche strutturali; la maggior parte degli studi potrebbe pertanto venire effettuata sull'uno o sull'altro sesso. L'esistenza di dati che dimostrano differenze rilevanti fra i maschi e le femmine (ad es. differenze riguardanti la tossicità sistemica, il metabolismo, la biodisponibilità, la tossicità del midollo osseo, ecc., incluso ad es. un *range-finding test*) incoraggerebbero l'uso di entrambi i sessi. Nella fattispecie potrebbe essere appropriato effettuare uno studio su entrambi i sessi, ad es. come parte di uno studio di tossicità a dose ripetuta. Nel caso si effettuino prove su entrambi i sessi potrebbe essere adeguato ricorrere al metodo fattoriale. Nell'appendice 2 figurano precisazioni sulle modalità di analisi dei dati in base a tale metodo.

All'inizio dello studio, la dimensione stabilita del gruppo deve consentire di disporre, in ogni gruppo, di almeno 5 animali analizzabili dello stesso sesso, o di ogni sesso se sono usati entrambi. Se l'esposizione umana a sostanze chimiche è specifica per un sesso, ad esempio nel caso di alcuni prodotti farmaceutici, il test deve essere eseguito su animali di tale sesso. A titolo di orientamento sul numero massimo di animali tipicamente necessario, uno studio sul midollo osseo con due momenti di campionamento, con tre gruppi di trattamento e un gruppo di controllo negativo parallelo, più un gruppo di controllo positivo (ogni gruppo composto da cinque animali dello stesso sesso), richiederebbe 45 animali.

Livelli di dose

Se viene effettuato uno studio preliminare di *range-finding* poiché non sono già disponibili dati appropriati per orientare la scelta delle dosi, tale studio deve essere svolto nello stesso laboratorio, usando specie, ceppi, sesso e un regime di trattamento identici a quelli che saranno utilizzati nello studio principale (10). Lo studio preliminare serve a individuare la dose massima tollerata (MTD), definita come la dose più alta che sarà tollerata per la durata della prova senza che appaia una tossicità che limita lo studio (inducendo ad esempio un calo del peso corporeo o citotossicità del sistema emopoietico, ma che non provoca morte o segni di dolore, sofferenza o stress che rendano necessaria una soppressione incruenta (11)).

La dose massima può essere definita anche come la dose che produce qualche segno di tossicità nel midollo osseo.

Le sostanze chimiche che comportano saturazione delle caratteristiche tossicocinetiche o che inducono processi di detossificazione che possono portare a una diminuzione dell'esposizione dopo un trattamento a lungo termine possono essere considerate eccezioni rispetto ai criteri di definizione della dose e vanno valutate caso per caso.

Per ottenere informazioni sulla relazione dose-risposta, uno studio completo deve includere un gruppo di controllo negativo e almeno tre livelli di dose, generalmente separati da un fattore 2, ma non più di 4. Se la sostanza chimica in esame non provoca alcuna tossicità nell'ambito di un test di *range-finding* o secondo quanto emerge dai dati esistenti, la dose massima per una singola somministrazione deve essere di 2 000 mg/kg di peso corporeo. Se la sostanza chimica in

▼M7

esame provoca invece tossicità, la MTD deve corrispondere alla dose più elevata somministrata, e i livelli di dose utilizzati devono essere compresi in un intervallo che va dalla tossicità massima a una tossicità modica o assente. Quando una tossicità del tessuto bersaglio (midollo osseo) è osservata a tutti i livelli di dose di prova, è consigliabile un ulteriore studio con dosi non tossiche. Gli studi volti a descrivere più pienamente le informazioni quantitative sulla relazione dose-risposta possono richiedere gruppi di trattamento supplementari. Per certi tipi di sostanze chimiche in esame (ad es. medicinali per uso umano) per le quali valgono specifici requisiti, i limiti possono variare.

Prova limite

Se gli esperimenti per determinare gli intervalli di dose o i dati disponibili relativi ai ceppi di animali affini indicano che un trattamento uguale o superiore alla dose limite (sotto descritta) non produce effetti tossici osservabili (comprese nessuna depressione della funzione del midollo osseo o altre manifestazioni di citotossicità del tessuto bersaglio), e se non si prevede genotossicità sulla base degli studi di genotossicità in vitro o dei dati relativi alle sostanze chimiche strutturalmente affini, uno studio completo con tre livelli di dose può non essere considerato necessario, purché sia stato dimostrato che la sostanza o le sostanze chimiche in esame raggiungono il tessuto bersaglio (midollo osseo). In tali casi può essere sufficiente un solo livello di dose, corrispondente alla dose limite. Per un periodo di somministrazione di >14 giorni, la dose limite è 1 000 mg/kg di peso corporeo al giorno. Per periodi di somministrazione di 14 giorni o meno, la dose limite è 2 000 mg/kg/ di peso corporeo al giorno.

Somministrazione delle dosi

Nella concezione di un saggio va considerata la via d'esposizione umana prevista. Pertanto possono essere scelti, se giustificati, vie di somministrazione quali l'alimentazione, l'acqua potabile, la via sottocutanea locale, la via endovenosa, la via orale (sonda gastrica), inalatoria, intratracheale, o l'impianto. In ogni caso, deve essere scelta la via che garantisce un'adeguata esposizione del o dei tessuti bersaglio. L'iniezione intraperitoneale non è generalmente raccomandata in quanto non si tratta di una via di esposizione umana prevista, e va utilizzata solo con una specifica giustificazione scientifica. Se la sostanza chimica in esame è miscelata nell'alimentazione o nell'acqua occorre fare attenzione, specialmente nei casi di dosaggio singolo, che il lasso di tempo fra l'assunzione del cibo e dell'acqua e il campionamento sia sufficiente per consentire l'individuazione degli effetti (cfr. i paragrafi 33-34). Il volume massimo di liquido somministrabile in un'unica volta con sonda gastrica o con iniezione dipende dalle dimensioni dell'animale da laboratorio. Esso non deve generalmente essere superiore a 1 ml/100 g di peso corporeo, tranne nel caso delle soluzioni acquose che possono essere somministrate in quantità pari a massimo 2 ml/100 g di peso corporeo. L'uso di volumi maggiori deve essere giustificato. Salvo nel caso di sostanze chimiche irritanti o corrosive, i cui effetti di norma tendono a esacerbarsi con l'aumentare della concentrazione, la variabilità del volume somministrato deve essere ridotta al minimo adeguando la concentrazione, in modo da garantire la somministrazione di un volume costante in relazione al peso corporeo per tutti i livelli di dose.

Programma di trattamento

Le sostanze chimiche in esame sono di norma somministrate in un'unica presa, ma possono essere somministrate anche in prese frazionate (due prese nello stesso giorno, a distanza di qualche ora al massimo) per agevolare la somministrazione di un grosso volume. In queste situazioni, o in caso di somministrazione della sostanza chimica in esame per inalazione, il momento del campionamento deve essere programmato in base al momento di somministrazione dell'ultima dose o della fine dell'esposizione.

Vi sono pochi dati disponibili sull'idoneità di un protocollo a dosi ripetute per questa prova. Tuttavia, qualora sia auspicabile integrare la prova in questione con un test di tossicità a dosi ripetute, occorre fare attenzione a evitare la perdita delle cellule mitotiche che presentano danni cromosomici, fenomeno che può verificarsi con le dosi tossiche. Una tale integrazione è accettabile quando la dose massima è superiore o pari alla dose limite (cfr. il paragrafo 29), e la dose limite

▼M7

è somministrata a un gruppo di trattamento per tutta la durata del trattamento. Il test del micronucleo (metodo di prova B.12) va considerato come il test in vivo prescritto per le aberrazioni cromosomiche quando è auspicata un'integrazione con altri studi.

I campioni di midollo osseo devono essere prelevati in due momenti diversi dopo i singoli trattamenti. Per i roditori, il primo intervallo di campionamento deve corrispondere al tempo necessario per completare una volta e mezza la durata del ciclo cellulare normale (che è generalmente di 12-18 ore dopo il periodo del trattamento). Poiché il tempo necessario affinché la sostanza o le sostanze chimiche in esame siano assorbite e metabolizzate e producano effetti sulla cinetica del ciclo cellulare può influire sul momento ottimale per l'individuazione delle aberrazioni cromosomiche, si raccomanda di prelevare un altro campione 24 ore dopo. Al momento del primo campionamento, tutti i gruppi di trattamento devono essere trattati e i campioni per l'analisi prelevati, mentre al momento del o dei campionamenti successivi deve essere somministrata solo la dose massima. Se il protocollo di trattamento è più lungo di un giorno in base a una giustificazione scientifica, si deve procedere ad un unico campionamento una volta trascorso un periodo equivalente fino a circa una volta e mezza la durata normale del ciclo cellulare dopo l'ultima somministrazione.

Dopo il trattamento e prima della raccolta dei campioni, agli animali viene iniettata per via intraperitoneale un'adeguata dose di un agente inibitore della metafase (ad es. colcemid o colchicina), e i campioni sono prelevati successivamente a un intervallo appropriato. Per i topi questo intervallo è di circa 3-5 ore prima della raccolta, e per i ratti è di 2-5 ore. Le cellule sono prelevate dal midollo osseo, sono ingrandite, fissate e colorate, e analizzate ai fini dell'individuazione di aberrazioni cromosomiche (12).

Osservazioni

Gli animali da laboratorio devono essere oggetto di osservazioni cliniche generali e i segni clinici devono essere registrati almeno una volta al giorno, preferibilmente alla stessa o alle stesse ore e tenendo conto del periodo di massima intensità degli effetti previsti dopo la somministrazione. Almeno due volte al giorno, durante il periodo di somministrazione, tutti gli animali vengono esaminati al fine di determinare la morbilità e la mortalità. Tutti gli animali devono essere pesati all'inizio dello studio, almeno una volta alla settimana nel corso degli studi a dosi ripetute, e al momento della soppressione incruenta. Negli studi la cui durata è di almeno una settimana, la misurazione del consumo di cibo va eseguita almeno con cadenza settimanale. Se la sostanza in esame viene somministrata con l'acqua, il consumo di acqua va misurato ad ogni cambio dell'acqua e almeno una volta alla settimana. Gli animali che manifestano segni di eccessiva, ma non letale, tossicità vanno soppressi in modo incruento prima della fine del periodo di saggio (11).

Esposizione del tessuto bersaglio

Ove ciò sia giustificato e non esistano altri dati sull'esposizione (cfr. il paragrafo 44), al o ai momenti idonei va prelevato un campione di sangue per esaminare i livelli delle sostanze chimiche in esame nel plasma, allo scopo di dimostrare l'avvenuta esposizione del midollo osseo.

Midollo osseo e preparazioni cromosomiche

Immediatamente dopo la soppressione incruenta, dai femori e dalle tibie degli animali vengono prelevate le cellule del midollo osseo, che vengono esposte a una soluzione ipotonica e fissate. Le cellule in metafase vengono poi poste sui vetrini e colorate secondo metodi prestabiliti (cfr. (3) (12)).

▼M7

Analisi

Tutti i vetrini, compresi quelli dei controlli positivi e negativi, devono essere codificati indipendentemente prima dell'analisi, e devono essere randomizzati in modo che l'analista non conosca le condizioni del trattamento.

Come misura della citotossicità deve essere determinato il coefficiente mitotico in almeno 1 000 cellule per animale, in tutti gli animali trattati (compresi i controlli positivi), e nei controlli negativi non trattati o con somministrazione della sostanza chimica in esame in solvente/mezzo disperdente.

Per individuare le aberrazioni cromosomiche strutturali, inclusi ed esclusi i gap, devono essere analizzate almeno 200 metafasi per ogni animale (6). Tuttavia, se la banca dati dei controlli negativi storici indica che la frequenza di fondo media delle aberrazioni cromosomiche strutturali nel laboratorio di prova è <1 %, occorre prendere in considerazione l'opportunità di esaminare cellule supplementari. Le aberrazioni di tipo cromatidico e cromosomico devono essere registrate separatamente e classificate in sottotipi (rotture, scambi). Le procedure in uso nel laboratorio devono garantire che l'analisi delle aberrazioni cromosomiche sia effettuata da analisti qualificati e, se appropriato, che sia oggetto di una revisione inter pares. Poiché le procedure di preparazione dei vetrini causano spesso la rottura di una parte delle cellule in metafase, con perdita di cromosomi, le cellule conteggiate devono quindi contenere un numero di centromeri non inferiore a $2n\pm2$, dove n è il numero aploide di cromosomi per quella specie.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

I dati relativi a ciascun animale vanno presentati sotto forma di tabella. Per ogni animale devono essere indicati l'indice mitotico, il numero di cellule in metafase conteggiate, il numero di aberrazioni per ogni cellula in metafase e la percentuale di cellule con aberrazioni cromosomiche strutturali. Devono essere elencati i diversi tipi di aberrazioni cromosomiche strutturali, con il relativo numero e la frequenza per i gruppi trattati e i gruppi di controllo. I gap, così come le cellule poliploidi e le cellule con cromosomi endoriduplicati sono registrati separatamente. La frequenza dei gap viene indicata nella relazione, ma non viene generalmente inclusa nell'analisi della frequenza totale delle aberrazioni strutturali. Se non c'è un'evidente differenza di risposta tra i sessi, i dati possono essere combinati nell'analisi statistica. Nella relazione devono anche figurare i dati riguardanti la tossicità animale e i segni clinici.

Criteri di accettabilità

L'accettabilità delle prove si basa sui seguenti criteri:

a) l'aggiunta dei dati sui controlli negativi paralleli alla banca dati di controlli storici del laboratorio è ritenuta accettabile (cfr. i paragrafi 11-14);

b) i controlli positivi paralleli o i controlli ai fini del conteggio devono indurre risposte compatibili con quelle ottenute dalle banche dati dei controlli positivi storici e devono produrre un aumento statisticamente significativo rispetto al controllo negativo (cfr. i paragrafi 20-21);

c) è stato analizzato il numero adeguato di dosi e cellule;

d) i criteri per la scelta della dose massima sono coerenti con quelli descritti ai paragrafi 25-28.

Valutazione e interpretazione dei risultati

A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è ritenuta chiaramente positiva se:

▼M7

a) almeno uno dei gruppi di trattamento manifesta un aumento statisticamente significativo della frequenza delle cellule con aberrazioni cromosomiche strutturali (gap esclusi) rispetto al controllo negativo parallelo;

b) una valutazione con un test di tendenza adeguato mostra che tale aumento è correlato alla dose almeno per uno dei momenti del campionamento, e

c) uno o più risultati si situano al di fuori della distribuzione dei dati di controllo negativi storici (ad es. limiti del controllo al 95 % in base alla distribuzione di Poisson)

Se in un particolare momento del campionamento viene esaminata solo la dose massima, la sostanza chimica in esame è ritenuta chiaramente positiva se vi è un aumento statisticamente significativo rispetto al controllo negativo parallelo, e i risultati sono al di fuori della distribuzione dei dati di controllo negativi storici (ad es. limiti del controllo al 95 % in base alla distribuzione di Poisson). Raccomandazioni relative agli appropriati metodi statistici figurano nella letteratura (13). Quando si effettua un'analisi della relazione dose-risposta, devono essere analizzati almeno tre gruppi di trattamento. Nei test statistici l'unità sperimentale deve essere l'animale. L'ottenimento di risultati positivi nella prova di aberrazione cromosomica indica che la sostanza chimica in esame induce aberrazioni cromosomiche strutturali nel midollo osseo della specie esaminata.

A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è ritenuta chiaramente negativa se in tutte le condizioni sperimentali esaminate:

a) nessuno dei gruppi di trattamento manifesta un aumento statisticamente significativo della frequenza delle cellule con aberrazioni cromosomiche strutturali (gap esclusi) rispetto al controllo negativo parallelo;

b) una valutazione con un test di tendenza adeguato mostra che in nessuno dei momenti del campionamento vi è un aumento correlato alla dose,

c) tutti i risultati si situano entro la distribuzione dei dati di controllo negativi storici (ad es. limiti del controllo al 95 % in base alla distribuzione di Poisson), e

d) l'esposizione del midollo osseo alla sostanza chimica in esame è effettivamente avvenuta.

Raccomandazioni relative ai metodi statistici più appropriati figurano nella letteratura (13). L'esposizione del midollo osseo alla sostanza chimica in esame può essere dimostrata, ad esempio, da un calo dell'indice mitotico, o dalla misurazione del livello delle sostanze in esame nel plasma o nel sangue In caso di somministrazione per via endovenosa, la prova dell'esposizione non è necessaria. In alternativa, l'esposizione del midollo osseo può essere dimostrata ricorrendo ai dati ADME, ottenuti nell'ambito di uno studio indipendente usando la stessa via di somministrazione e le stesse specie. L'ottenimento di risultati negativi indica che, nelle condizioni di prova, la sostanza chimica in esame non induce aberrazioni cromosomiche strutturali nel midollo osseo delle specie esaminate.

Non è necessario verificare una risposta chiaramente positiva o chiaramente negativa.

Nei casi in cui la risposta non sia chiaramente negativa né chiaramente positiva, per poter stabilire la rilevanza biologica di un risultato (ad es. un aumento debole o marginale), i dati devono venire sottoposti al giudizio di esperti e/o a indagini più approfondite sugli esperimenti portati a termine. In alcuni casi può essere utile analizzare più cellule o ripetere l'esperienza in condizioni sperimentali modificate.

▼M7

In rari casi, anche dopo ulteriori indagini, i dati non permetteranno di concludere se la sostanza chimica in esame produce risultati positivi o negativi, e lo studio dovrà pertanto essere dichiarato ambiguo.

La frequenza delle metafasi poliploidi e delle metafasi con endoriduplicazione, rispetto al numero totale delle metafasi, va registrata separatamente. Un aumento del numero di cellule poliploidi/endoriduplicate può indicare che la sostanza chimica in esame è in grado di inibire il processo mitotico o il ciclo cellulare (cfr. il paragrafo 3).

Relazione sulla prova

La relazione sulla prova deve comprendere le informazioni seguenti:

Sintesi

Sostanza chimica in esame:

— origine, numero di lotto e data di scadenza, se disponibile;

— stabilità della sostanza chimica in esame, se nota.

Sostanza monocomponente:

— natura fisica, idrosolubilità, e altre proprietà fisico-chimiche rilevanti;

— identificazione chimica: nome IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula di struttura, purezza, identità chimica delle impurità, se del caso e realizzabile in pratica, ecc.

Sostanza multicomponente, sostanze UVCB e miscele:

— caratterizzate, nella misura del possibile, tramite l'identità chimica (cfr. supra), le proporzioni quantitative e le proprietà fisico-chimiche rilevanti dei componenti.

Preparazione della sostanza chimica in esame:

— motivazione della scelta del mezzo disperdente;

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se note;

— preparazione dei preparati per somministrazione via alimentare, con l'acqua da bere e per inalazione;

— determinazione analitica dei preparati (ad esempio, stabilità, omogeneità, concentrazioni nominali), se effettuata.

Animali da laboratorio:

— specie/ceppi usati e giustificazione dell'utilizzo;

— numero, età e sesso degli animali;

— origine, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.;

— metodo di identificazione univoca degli animali;

— per gli studi a breve termine: peso dei singoli animali all'inizio e alla fine del saggio; per gli studi di durata superiore a una settimana: peso individuale durante lo studio e consumo di cibo. Devono essere inclusi l'intervallo, la media e la deviazione standard per ciascun gruppo.

▼M7

Condizioni di prova:

— controlli positivi e negativi (mezzo disperdente/solvente);

— dati del test di *range-finding*, se effettuato;

— criteri di selezione delle dosi;

— dettagli della preparazione della sostanza chimica in esame;

— modalità precise di somministrazione della sostanza chimica in esame;

— criteri di scelta della via e della durata della somministrazione;

— metodi usati per verificare che la sostanza o le sostanze in esame siano entrate in circolo o abbiano raggiunto il midollo osseo;

— dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno) calcolata in funzione della concentrazione (ppm) della sostanza chimica in esame contenuta nella dieta/acqua da bere e del consumo, se del caso;

— dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua;

— metodo di soppressione incruenta;

— metodo di analgesia (se usato);

— descrizione dettagliata dello schema di trattamento e di campionamento e giustificazione delle scelte;

— metodi di preparazione dei vetrini;

— metodi di misurazione della tossicità;

— natura del prodotto chimico inibitore della metafase, concentrazione, dosaggio e tempi di somministrazione prima del campionamento;

— procedure di isolamento e conservazione dei campioni;

— criteri di conteggio delle aberrazioni;

— numero di cellule in metafase esaminate per ogni animale e numero di cellule esaminate ai fini della determinazione dell'indice mitotico;

— criteri di accettabilità dello studio;

— criteri in base ai quali considerare lo studio positivo, negativo, o senza risultati.

Risultati:

— condizioni dell'animale prima e durante il periodo di saggio, compresi i segni di tossicità;

— indice mitotico, indicato separatamente per ciascun animale;

— tipo e numero di aberrazioni e di cellule aberranti, indicati separatamente per ciascun animale;

— numero totale delle aberrazioni per gruppo, con medie e deviazioni standard;

— numero di cellule che presentano aberrazioni per gruppo, con medie e deviazioni standard;

— eventuali cambiamenti di ploidia, comprese le frequenze delle cellule poliploidi e/o delle cellule endoriduplicate;

▼M7

— relazione dose-risposta, ove possibile;

— analisi e metodo statistico applicati;

— dati comprovanti l'avvenuta esposizione del midollo osseo;

— dati dei controlli negativi e positivi paralleli con intervalli, medie e deviazioni standard;

— dati sui controlli negativi e positivi storici con intervalli, medie e deviazioni standard, e limiti del controllo al 95 % per la distribuzione, così come il periodo di tempo interessato e il numero di osservazioni;

— criteri stabiliti ai fini di una risposta positiva o negativa.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

Riferimenti.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Adler, I.D. (1984), «Cytogenetic Tests in Mammals», in Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275-306.

(3) Preston, R.J. *et al*. (1987), Mammalian in vivo cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, Vol. 189/2, pp. 157-165.

(4) Richold, M. *et al*. (1990), «In Vivo Cytogenetics Assays», in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

(5) Tice, R.R. *et al*. (1994), Report from the working group on the in vivo mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Vol. 312/3, pp. 305-312.

(6) Adler, I.D. *et al*. (1998), Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 417/1, pp. 19-30.

(7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(8) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(9) Hayashi, M. *et al*. (1994), in vivo rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.

(10) Fielder, R.J. *et al*. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in in vivo mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.

▼**M7**

(11) OECD (2000), «Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N° 19, OECD Publishing, Paris.

(12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, Vol. 1044, pp. 147-163.

(13) Lovell, D.P. *et al*. (1989), «Statistical Analysis of in vivo Cytogenetic Assays», in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

▼**M7**

Appendice 1

DEFINIZIONI

Aneuploidia: qualsiasi deviazione dal normale numero diploide (o aploide) di cromosomi da parte di uno o più cromosomi, ma non dai multipli delle intere serie di cromosomi (*cfr.* poliploidia).

Centromero: regione/i di un cromosoma sede di attacco del fuso durante la divisione cellulare, che permette il corretto movimento dei cromosomi figli verso i poli delle cellule figlie.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Aberrazione di tipo cromatidico: alterazione cromosomica strutturale che si manifesta nella rottura di un singolo cromatidio o nella rottura e ricongiunzione di cromatidi.

Aberrazione di tipo cromosomico: alterazione cromosomica strutturale che si manifesta nella rottura, o nella rottura e ricongiunzione, di entrambi i cromatidi in uno stesso punto.

Endoriduplicazione: processo nel quale, dopo una fase S di replicazione del DNA, il nucleo non inizia la mitosi ma inizia una nuova fase S. Ne risultano cromosomi con 4, 8, 16,... cromatidi.

Gap: regione non colorata (lesione acromatica) di un singolo cromatidio in cui vi è un disallineamento minimo del cromatidio.

Indice mitotico: rapporto fra il numero di cellule in mitosi e il numero totale di cellule in una popolazione, che indica lo stato di proliferazione di tale popolazione di cellule.

Aberrazione numerica: variazione del numero di cromosomi rispetto al numero diploide caratteristico della specie (aneuploidia).

Poliploidia: aberrazioni numeriche dei cromosomi che interessa l'intero corredo cromosomico di cellule o organismi, a differenza dall'aneuploidia, che invece interessa un solo cromosoma o più cromosomi, ma non l'intero corredo.

Aberrazione cromosomica strutturale: alterazione della struttura cromosomica visibile all'esame microscopico dello stadio di metafase, che si presenta con delezioni, perdita di segmenti, riordinamenti intercromosomici e intracromosomici.

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

▼M7

Appendice 2

METODO FATTORIALE PER INDIVIDUARE LE DIFFERENZE FRA I SESSI NEL SAGGIO IN VIVO SULLE ABERRAZIONI CROMOSOMICHE

Metodo fattoriale e analisi

Questo modello prevede di esporre 5 maschi e 5 femmine a ciascuna concentrazione sperimentale e comporta pertanto l'utilizzo di un minimo di 40 animali (20 maschi e 20 femmine più i relativi controlli positivi).

Il modello qui presentato — una delle forme semplici del modello fattoriale — è equivalente a un'analisi della varianza a due fattori, in cui il sesso e il livello delle concentrazioni costituiscono i fattori principali. I dati possono essere analizzati utilizzando diversi programmi statistici standard, quali SPSS, SAS, STATA, Genstat o il programma R.

A partire dall'insieme dei dati si determina la variabilità tra i sessi e le concentrazioni, nonché la variabilità relativa alle interazioni tra sessi e concentrazioni. Ciascuno di questi aspetti è quindi valutato in rapporto alla stima della variabilità tra gli animali ripartiti nei gruppi di animali dello stesso sesso esposti alle stesse concentrazioni. Maggiori informazioni su questa metodologia sono reperibili in diversi manuali standard di statistica (cfr. bibliografia), nonché nelle schede «di aiuto» fornite con i programmi statistici.

In seguito viene esaminata l'interazione sesso x concentrazione in una tabella ANOVA ([1]). In assenza di un termine di interazione significativo la combinazione dei valori inter-sessi o inter-livelli di concentrazione consente di effettuare test statistici validi tra i livelli, basandosi sul termine di variabilità intra-gruppo combinata di 'ANOVA.

L'analisi prosegue suddividendo la variabilità stimata tra le concentrazioni in modo da ottenere contrasti che permettano di stabilire contrasti lineari e quadratici delle risposte per l'insieme dei livelli di concentrazione. Quando si riscontra un'interazione significativa sesso x concentrazione, questo termine può essere a sua volta in ripartito in contrasti di interazione lineare x sesso e quadratica x sesso. In questo modo si può verificare se le risposte alle concentrazioni sono parallele per i due sessi o se vi è una differenza riconducibile al sesso.

La stima della variabilità intra-gruppo combinata può essere utilizzata per verificare lo scarto tra le medie, confrontandole due a due. I confronti possono essere effettuati tra le medie per i due sessi e tra le medie dei diversi livelli delle concentrazioni (come, ad esempio, confronti tra i livelli dei controlli negativi). Nei casi in cui si registra un'interazione significativa i confronti possono essere effettuati tra le medie di concentrazioni diverse per lo stesso sesso o tra le medie dei due sessi a parità di concentrazione.

Riferimenti

Numerosi manuali di statistica esaminano la teoria, la concezione, la metodologia, l'analisi e l'interpretazione dei modelli fattoriali, dall'analisi più semplice, a due fattori, alle forme più complesse utilizzate per la metodologia *Design of Experiment*. Di seguito ne è riportato un elenco non completo. Alcuni manuali forniscono esempi di modelli comparabili e, in alcuni casi, forniscono un codice che permette di effettuare l'analisi utilizzando diversi programmi.

([1]) Gli statistici che applicano una metodologia di modellizzazione quale l'utilizzo dei modelli lineari generalizzati (GLM) possono effettuare l'analisi in modo diverso ma comparabile, senza tuttavia ricavare necessariamente la tradizionale tabella ANOVA che risale a concetti algoritmici del calcolo statistico elaborati in epoca preinformatica.

▼M7

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

B.12. PROVA SUI MICRONUCLEI NEGLI ERITROCITI DI MAMMIFERO

INTRODUZIONE

Il presente metodo di prova è equivalente alle linee guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 474 (2016), e fa parte di una serie di metodi di prova di tossicologia genetica. È stato elaborato un documento OCSE contenente informazioni succinte sulle prove di tossicologia genetica e un compendio delle modifiche recentemente apportate alla rispettiva linea guida (1).

La prova in vivo sui micronuclei dei mammiferi è particolarmente rilevante per valutare la genotossicità. Difatti, benché possano variare a seconda delle specie, i fattori del metabolismo in vivo, gli aspetti farmacocinetici e i processi di riparazione del DNA sono attivi e contribuiscono alle reazioni. La prova in vivo è inoltre utile per studiare più approfonditamente la genotossicità rilevata tramite un sistema in vitro.

La prova in vivo sui micronuclei dei mammiferi è utilizzato per individuare i danni indotti dalla sostanza chimica in esame sui cromosomi o sull'apparato mitotico degli eritoblasti. Esso valuta la formazione di micronuclei in eritrociti provenienti dal midollo osseo o dalle cellule del sangue periferico di animali, di norma roditori.

Lo scopo della prova sui micronuclei è individuare le sostanze chimiche che provocano danni citogenetici, che si manifestano nella formazione di micronuclei contenenti frammenti residui di cromosomi o cromosomi interi.

Quando da un eritroblasto del midollo osseo si sviluppa un eritrocita immaturo (designato a volte anche come eritrocita policromatico o reticolocito), il nucleo principale viene espulso; i micronuclei formatisi possono rimanere nel citoplasma. In queste cellule la visualizzazione o il rilevamento dei micronuclei sono facilitati poiché manca il nucleo principale. L'aumento della frequenza di eritrociti immaturi contenenti micronuclei negli animali trattati è un'indicazione di aberrazioni cromosomiche strutturali o numeriche indotte.

Gli eritrociti contenenti micronuclei di nuova formazione sono individuati e quantificati mediante colorazione, seguita o da un conteggio visivo al microscopio, o da un'analisi automatizzata. Il conteggio di un numero sufficiente di eritrociti immaturi nel sangue periferico o nel midollo osseo degli animali adulti è grandemente facilitato dall'uso di una piattaforma di calcolo automatizzata. Tali piattaforme sono alternative accettabili alla valutazione manuale (2). Studi comparativi hanno mostrato che tali metodi, usando standard di calibrazione adeguati, possono consentire riproducibilità inter- e intra-laboratorio e sensibilità migliore di quella consentita dal conteggio manuale al microscopio (3) (4). I sistemi automatizzati che possono misurare la frequenza degli eritrociti contenenti micronuclei includono (ma non sono limitati a questi): citometri a flusso (5), piattaforme di analisi delle immagini (6) (7), e citometri a scansione laser (8).

Benché generalmente non rientri nella prova, i frammenti di cromosomi possono essere distinti dai cromosomi interi in base a una serie di criteri. Questi includono la presenza o l'assenza del cinetocore, o del centromero, entrambi caratteristici dei cromosomi intatti. L'assenza del cinetocore, o del centromero, indica che il micronucleo contiene solo frammenti di cromosomi, mentre la presenza è indicativa di una perdita cromosomica.

Le definizioni della terminologia usata figurano nell'Appendice 1.

▼M7

CONSIDERAZIONI INIZIALI

In questo saggio il tessuto bersaglio delle lesioni genetiche è il midollo osseo di roditori adulti giovani. In questo tessuto sono difatti prodotti gli eritrociti. La misurazione dei micronuclei negli eritrociti immaturi del sangue periferico può essere effettuata in altre specie di mammiferi per i quali è stata dimostrata una sensibilità sufficiente per l'individuazione di sostanze chimiche che provocano aberrazioni cromosomiche strutturali o numeriche in queste cellule (tramite induzione di micronuclei negli eritrociti immaturi), e a condizione che ciò sia giustificato sul piano scientifico. L'endpoint è la frequenza degli eritrociti immaturi micronucleati. La frequenza degli eritrociti maturi contenenti micronuclei nel sangue periferico può anch'essa essere utilizzata come endpoint nelle specie che non presentano una forte selezione splenica contro le cellule contenenti micronuclei e quando gli animali sono trattati continuativamente per un periodo superiore alla durata di vita di un eritrocita nella specie utilizzata (ad es., nel topo, 4 settimane o più).

Se è comprovato che la sostanza o le sostanze chimiche in esame, o i loro metaboliti, non raggiungono il tessuto bersaglio, può non essere opportuno utilizzare questa prova.

Prima dell'uso del metodo di prova su una miscela, per la generazione di dati per un determinato scopo normativo, occorre esaminare se, e in caso affermativo perché, può fornire risultati adeguati a tale scopo. Tali considerazioni non sono necessarie in presenza di un obbligo normativo di prova sulla miscela.

PRINCIPIO DELLA PROVA

Gli animali sono esposti alla sostanza chimica in esame attraverso un'adeguata via d'esposizione. Se si utilizza il midollo osseo, al momento / ai momenti opportuni, dopo il trattamento, gli animali sono soppressi in modo incruento. Il midollo osseo viene estratto, e si procede alle preparazioni e alle colorazioni (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Quando si utilizza il sangue periferico, il sangue viene raccolto al momento / ai momenti opportuni dopo il trattamento e si procede alle preparazioni e alle colorazioni (12) (16) (17) (18). In caso di somministrazione acuta del trattamento, è importante effettuare il prelievo del midollo osseo o del sangue in un momento in cui l'induzione di eritrociti immaturi micronucleati dovuta al trattamento possa essere individuata. In caso di prelievo di sangue periferico, perché tali elementi appaiano nella circolazione sanguigna deve essere trascorso un lasso di tempo sufficiente. Le preparazioni sono analizzate ai fini dell'individuazione dei micronuclei, tramite visualizzazione con microscopio, analisi delle immagini, citometri a flusso, oppure citometria a scansione laser.

VERIFICA DELLA COMPETENZA DEL LABORATORIO

Prove di competenza

Per accertare che il laboratorio possieda un'esperienza sufficiente nella conduzione del saggio prima di utilizzarlo nelle prove di routine, il laboratorio deve dimostrare la capacità di riprodurre i risultati attesi dai dati pubblicati (17) (19) (20) (21) (22) riguardanti le frequenze dei micronuclei, con un minimo di due sostanze per i controlli positivi (incluse le risposte deboli indotte da dosi basse di sostanze per i controlli positivi), come quelle elencate nella tabella 1, e con controlli su mezzi disperdenti/solventi compatibili (cfr. il paragrafo 26). Le dosi utilizzate nel corso di tali sperimentazioni devono produrre aumenti riproducibili e collegati alle dosi somministrate, e devono dimostrare la sensibilità e l'intervallo dinamico del sistema di analisi sul tessuto in questione (il midollo osseo o il sangue periferico). Il metodo di conteggio deve essere quello che sarà usato dal laboratorio. Questo requisito non si applica ai laboratori con esperienza, che dispongono cioè di una base di dati storica quale definita ai paragrafi 14-18.

Dati di controllo storici

Nell'ambito delle prove di competenza il laboratorio deve stabilire:

— gamma e distribuzione dei controlli positivi storici, e

▼M7

— gamma e distribuzione dei controlli negativi storici.

All'acquisizione dei primi dati di distribuzione dei controlli negativi storici, è necessario che i controlli negativi paralleli siano coerenti con i dati di controllo pubblicati, se esistenti. Con l'aumento dei dati sperimentali aggiunti alla distribuzione dei controlli storici, i controlli negativi paralleli dovrebbero idealmente situarsi entro i limiti di tale controllo al 95 % di tale distribuzione. La banca dati dei controlli negativi storici del laboratorio deve essere solida sotto il profilo statistico per garantire la capacità del laboratorio di valutare la distribuzione dei suoi dati di controllo negativi. La letteratura suggerisce che possa essere necessario un minimo di 10 esperimenti, ma che sarebbe preferibile contarne almeno 20, svolti in analoghe condizioni sperimentali. I laboratori devono utilizzare metodi di controllo della qualità, quali diagrammi di controllo (ad esempio carte C o carte X medio (23)), per rivelare la variabilità dei loro dati e dimostrare che la metodologia è «sotto controllo» nel laboratorio. Ulteriori raccomandazioni su come sviluppare e utilizzare i dati storici (cioè i criteri per l'inclusione e l'esclusione di dati nelle serie storiche e i criteri di accettabilità per un determinato esperimento) sono reperibili nella letteratura scientifica (24).

Se nell'ambito delle prove di competenza (descritte al paragrafo 13) il laboratorio non porta a termine un numero sufficiente di esperimenti per stabilire una distribuzione dei controlli negativi statisticamente solida (cfr. il paragrafo 15), si può accettare che la distribuzione sia definita durante i primi test di routine. Questo approccio deve seguire le raccomandazioni formulate nella letteratura (24), e i risultati dei controlli negativi ottenuti in questi esperimenti devono essere coerenti con i dati di controllo negativi pubblicati.

Eventuali modifiche apportate al protocollo sperimentale devono essere considerate in base alle loro ripercussioni sulla coerenza fra i nuovi dati e le esistenti banche dati di controlli storici del laboratorio. Solo le incongruenze significative dovrebbero portare alla creazione di una nuova banca dati di controlli storici, se il parere di un esperto stabilisce che vi è una differenza rispetto alla distribuzione precedente (cfr. il paragrafo 15). Durante la costituzione di questa nuova banca dati, il laboratorio non ha necessariamente bisogno di una banca dati completa di controlli negativi per permettere lo svolgimento di una prova, a condizione che esso possa dimostrare che i valori dei controlli negativi paralleli rimangano coerenti con la precedente banca dati o con i dati corrispondenti pubblicati.

I dati sui controlli negativi devono riguardare l'incidenza degli eritrociti immaturi micronucleati in ogni animale. I controlli negativi paralleli dovrebbero idealmente situarsi entro i limiti di tale controllo al 95 % della distribuzione della banca dati dei controlli negativi storici del laboratorio. Qualora i dati dei controlli negativi paralleli non rientrino nei limiti del controllo al 95 % possono essere accettabili per l'inserimento nella distribuzione dei controlli storici purché non siano *outlier* estremi e sia provato che il sistema di prova è «sotto controllo» (cfr. il paragrafo 15) e che non si sono verificati errori tecnici o umani.

DESCRIZIONE DEL METODO

Preparazione

Selezione delle specie animali

Di preferenza sono utilizzati individui adulti, giovani e in buona salute, provenienti da ceppi di animali da laboratorio. Si può ricorrere a topi, ratti, o ad altre specie idonee di mammiferi. Quando si utilizza il sangue periferico, occorre accertare che la rimozione splenica delle cellule micronucleate dalla circolazione non comprometta l'individuazione dei micronuclei indotti nelle specie selezionate. Questo è stato chiaramente dimostrato per il sangue periferico del topo e del

▼M7

ratto (2). L'utilizzazione di specie diverse dai ratti e dai topi deve essere scientificamente giustificata nella relazione. Se si ricorre a specie diverse dai roditori, viene raccomandato di integrare la misurazione dei micronuclei indotti dalle aberrazioni cromosomiche del midollo osseo in un'altra prova di tossicità pertinente.

Condizioni di stabulazione e alimentazione degli animali

Per i roditori, la temperatura dello stabulario deve essere mantenuta a 22 °C (± 3 °C). Idealmente l'umidità relativa deve essere del 50-60 %. Deve comunque essere come minino del 40 % e non deve preferibilmente superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità. Per l'alimentazione, attenersi alle diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata di acqua potabile. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di garantire un'adeguata miscela della sostanza in esame, se somministrata per questa via. Se non ci si aspetta alcun comportamento aggressivo i roditori vanno alloggiati in piccoli gruppi (non più di cinque in ogni gabbia) dello stesso sesso e gruppo di trattamento, preferibilmente in gabbie a fondo pieno con adeguato arricchimento ambientale. Gli animali possono essere alloggiati individualmente solo se ciò è giustificato sotto il profilo scientifico.

Preparazione degli animali

Sono generalmente utilizzati animali adulti, giovani e sani (i roditori hanno idealmente un'età di 6-10 settimane all'inizio del trattamento, ma sono accettati anche animali di età un pÓ più avanzata), che vengono suddivisi a caso in gruppi di controllo e di trattamento. I singoli animali sono identificati univocamente applicando un metodo incruento e il meno possibile invasivo (cioè inanellamento, etichettatura, applicazione di un microchip o identificazione biometrica, evitando il taglio delle orecchie o la falangectomia) e devono essere acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Deve essere evitata ogni contaminazione incrociata fra il controllo positivo e la sostanza chimica in esame. All'inizio dello studio la variazione di peso degli animali deve essere minima e non superare il ± 20 % del peso medio per ciascun sesso.

Preparazione delle dosi

Le sostanze solide in esame vanno sciolte o poste in sospensione in appropriati solventi o mezzi disperdenti o mescolate alla dieta o all'acqua da bere prima di essere somministrate agli animali. Le sostanze liquide possono essere somministrate direttamente o diluite prima del trattamento. In caso di esposizione per via inalatoria, le sostanze possono essere somministrate sotto forma di gas, vapore o aerosol solido o liquido, in funzione delle loro proprietà fisico-chimiche. Vanno usati preparati freschi della sostanza, a meno che i dati sulla stabilità dimostrino che la conservazione è accettabile e definiscano le adeguate condizioni di conservazione.

Condizioni sperimentali

Solvente/mezzo disperdente

Il solvente/mezzo disperdente non deve produrre effetti tossici ai livelli di dose usati e non deve poter reagire chimicamente con la sostanza in esame. L'uso di solventi/mezzi disperdenti poco noti è ammesso solo se suffragato da dati che ne provino la compatibilità. Si raccomanda di prendere in primo luogo in considerazione, se possibile, l'uso di un solvente/mezzo disperdente acquoso. Fra gli esempi di solventi/mezzi disperdenti compatibili e comunemente usati si possono menzionare l'acqua, la soluzione fisiologica, la soluzione di metilcellulosa, la soluzione di carbossimetilcellulosa sodica, l'olio di oliva e l'olio di mais. In mancanza di dati di controllo storici o pubblicati che dimostrino che un solvente/mezzo disperdente atipico prescelto non induce micronuclei o altri effetti nocivi, va effettuato uno studio iniziale per stabilire l'accettabilità del controllo del solvente/mezzo disperdente.

▼M7

Controlli

Controlli positivi

Ogni prova deve generalmente includere un gruppo di animali trattati con una sostanza usata per i controlli positivi. Questa condizione può essere eliminata quando il laboratorio di prova ha dimostrato la sua competenza nello svolgimento della prova e ha stabilito l'intervallo dei controlli positivi storici. Quando manca un gruppo di controllo positivo parallelo, in ogni esperimento devono essere inclusi controlli del conteggio (vetrini fissati e non colorati o campioni di sospensione cellulare, se appropriato ai fini del metodo di conteggio). Questo può avvenire includendo nello studio campioni di riferimento idonei ottenuti e conservati in occasione di un esperimento separato di controllo positivo svolto periodicamente (ad es. ogni 6-18 mesi); ad esempio, durante la verifica della competenze e successivamente, se necessario, su base periodica.

Le sostanze chimiche per i controlli positivi devono portare, in modo affidabile, a un aumento individuabile della frequenza dei micronuclei al di là del livello spontaneo. Quando si ricorre al conteggio manuale al microscopio, le dosi dei controlli positivi devono essere scelte in modo che gli effetti siano chiari ma non rivelino immediatamente all'analista l'identità dei campioni codificati. È ammissibile che le sostanze per i controlli positivi siano somministrate per una via diversa da quella della sostanza chimica in esame, usando un programma di trattamento diverso, e che il campionamento avvenga in un unico momento. È anche ammissibile, se appropriato, l'uso per i controlli positivi di sostanze di una classe chimica correlata. Nella tabella 1 figurano esempi di sostanze chimiche per i controlli positivi.

Tabella 1.

Esempi di sostanze chimiche per i controlli positivi.

Sostanze chimiche e CASRN
Metansolfonato di etile [CASRN 62-50-0]
Metansolfonato di metile [CASRN 66-27-3]
Etilnitrosourea [CASRN 759-73-9]
Mitomicina C [CASRN 50-07-7]
Ciclofosfamide (monoidrato) [CASRN 50-18-0 (CASRN 6055-19-2)]
Trietilenmelammina [CASRN 51-18-3]
Colchicina [CASRN 64-86-8] o vinblastina [CASRN 865-21-4] — come aneugeni

Controlli negativi

In ogni fase del campionamento devono essere inclusi animali del gruppo di controllo negativo, che sono gestiti nello stesso modo dei gruppi di trattamento, ma a cui non viene somministrata la sostanza chimica in esame. Se per la somministrazione della sostanza in esame si usa un solvente / mezzo disperdente, anche il gruppo di controllo deve riceverlo. Tuttavia, se da dati dei controlli negativi storici risulta una variabilità intraspecifica e una frequenza delle cellule con micronuclei coerente ad ogni fase del campionamento per il laboratorio di prova, può essere sufficiente un solo campionamento per il controllo negativo. In tal caso, esso deve avvenire al momento del primo campionamento effettuato nell'ambito dello studio.

▼M7

Se viene usato sangue periferico, un campione prelevato prima del trattamento può essere accettato al posto del controllo negativo parallelo per gli studi di breve durata, qualora i dati ottenuti siano coerenti con la banca dei dati di controllo storici del laboratorio di prova. Per i ratti è stato dimostrato che il campionamento pre-trattamento di piccoli volumi (ad es. < 100 µl/al giorno) ha un impatto minimo sulla frequenza di fondo dei micronuclei (25).

PROCEDURA

Numero e sesso degli animali

In generale, la risposta dei micronuclei è simile nei maschi e nelle femmine degli animali, e, pertanto, la maggior parte degli studi potrebbe pertanto venire effettuata sull'uno o sull'altro sesso (26). L'esistenza di dati che dimostrano differenze rilevanti fra i maschi e le femmine (ad es. differenze riguardanti la tossicità sistemica, il metabolismo, la biodisponibilità, la tossicità del midollo osseo, ecc., incluso ad es. in un *range-finding test*) incoraggerebbero l'uso di entrambi i sessi. Nella fattispecie potrebbe essere appropriato effettuare uno studio su entrambi i sessi, ad es. come parte di uno studio di tossicità a dose ripetuta. Nel caso si effettuino prove su entrambi i sessi potrebbe essere adeguato ricorrere al metodo fattoriale. Nell'Appendice 2 figurano precisazioni sulle modalità di analisi dei dati in base a tale metodo.

All'inizio dello studio, la dimensione stabilita del gruppo deve consentire di disporre, in ogni gruppo, di almeno 5 animali analizzabili dello stesso sesso, o di ogni sesso se sono usati entrambi. Se l'esposizione umana a sostanze chimiche è specifica per un sesso, ad esempio nel caso di alcuni prodotti farmaceutici, il test deve essere eseguito su animali di tale sesso. A titolo di orientamento sul numero massimo di animali tipicamente necessario, uno studio sul midollo osseo effettuato conformemente ai parametri stabiliti al paragrafo 37, con tre gruppi di trattamento e controlli negativi e positivi paralleli (ogni gruppo composto da cinque animali dello stesso sesso), richiederebbe fra i 25 e i 35 animali.

Livelli di dose

Se viene effettuato uno studio preliminare di *range-finding* poiché non sono già disponibili dati appropriati per orientare la scelta delle dosi, tale studio deve essere svolto nello stesso laboratorio, usando specie, ceppi, sesso e un regime di trattamento identici a quelli che saranno utilizzati nello studio principale (27). Lo studio preliminare serve a individuare la dose massima tollerata (MTD), definita come la dose più alta che sarà tollerata per la durata della prova senza che appaia una tossicità che limita lo studio (inducendo ad esempio un calo del peso corporeo o citotossicità del sistema emopoietico, ma senza provocare morte o segni di dolore, sofferenza o stress che rendano necessaria una soppressione incruenta (28)).

La dose massima può essere definita anche come la dose che produce tossicità nel midollo osseo (ad es. una diminuzione della proporzione di eritrociti immaturi rispetto al numero totale di eritrociti nel midollo osseo o nel sangue periferico di più del 50 %, ma senza che questa proporzione si riduca a meno del 20 % del valore di controllo). Tuttavia, dall'analisi delle cellule con reazione positiva al CD71 nella circolazione sanguigna periferica (con citometria a flusso), emerge che questa frazione di eritrociti immaturi molto giovani risponde alle sostanze tossiche più rapidamente della più ampia schiera di eritrociti immaturi positivi all'RNA. Pertanto, può apparire una tossicità apparente maggiore in caso di sperimentazioni che prevedono un'esposizione acuta seguita dall'esame della frazione di eritrociti immaturi positivi al CD71 rispetto alle metodologie che individuano gli eritrociti immaturi sulla base del contenuto di RNA. Per questa ragione, quando l'esperimento prevede cinque o meno giorni di trattamento, il livello di dose più elevato, e tossico, della sostanza chimica in esame può essere definito come la dose che provoca una riduzione statisticamente significativa della proporzione degli eritrociti immaturi positivi al CD71 rispetto al numero totale di eritrociti, senza che questa proporzione scenda al di sotto del 5 % del valore di controllo (29).

▼M7

Le sostanze chimiche che comportano saturazione delle caratteristiche tossicocinetiche o che inducono processi di detossificazione che possono portare a una diminuzione dell'esposizione dopo una somministrazione a lungo termine possono essere considerate eccezioni rispetto ai criteri di definizione della dose e vanno valutate caso per caso.

Per ottenere informazioni sulla relazione dose-risposta, uno studio completo deve includere un gruppo di controllo negativo e almeno tre livelli di dose, generalmente separati da un fattore 2, ma non più di 4. Se la sostanza chimica in esame non provoca alcuna tossicità nell'ambito di un test di *range-finding* o secondo quanto emerge dai dati esistenti, la dose massima per periodo di somministrazione di 14 giorni o più deve essere di 1 000 mg/kg di peso corporeo al giorno o, per periodi di somministrazione di meno di 14 giorni, di 2 000 mg/kg di peso corporeo al giorno. Se la sostanza chimica in esame provoca invece tossicità, la MTD deve corrispondere alla dose più elevata somministrata, e i livelli di dose utilizzati devono essere compresi in un intervallo che va dalla tossicità massima a una tossicità modica o assente. Quando una tossicità del tessuto bersaglio (midollo osseo) è osservata a tutti i livelli di dose di prova, è consigliabile un ulteriore studio con dosi non tossiche. Gli studi volti a descrivere più pienamente le informazioni quantitative sulla relazione dose-risposta possono richiedere gruppi di trattamento supplementari. Per certi tipi di sostanze chimiche in esame (ad es. medicinali per uso umano) per le quali valgono specifici requisiti, i limiti possono variare.

Prova limite

Se gli esperimenti per determinare gli intervalli di dose o i dati disponibili relativi ai ceppi di animali affini indicano che un trattamento uguale o superiore alla dose limite (sotto descritta) non produce effetti tossici osservabili (comprese nessuna depressione della funzione del midollo osseo o altre manifestazioni di citotossicità del tessuto bersaglio), e se non si prevede genotossicità sulla base degli studi di genotossicità in vitro o dei dati relativi alle sostanze chimiche strutturalmente affini, uno studio completo con tre livelli di dose può non essere considerato necessario, purché sia stato dimostrato che la sostanza o le sostanze chimiche in esame raggiungono il tessuto bersaglio (midollo osseo). In tali casi può essere sufficiente un solo livello di dose, corrispondente alla dose limite. Quando la somministrazione avviene per 14 giorni o più, la dose limite è 1 000 mg/kg di peso corporeo al giorno. Per periodi di somministrazione di meno di 14 giorni, la dose limite è 2 000 mg/kg/ di peso corporeo al giorno.

Somministrazione delle dosi

Nella concezione di un saggio va considerata la via d'esposizione umana prevista. Pertanto possono essere scelti, se giustificati, vie di somministrazione quali l'alimentazione, l'acqua potabile, la via sottocutanea locale, la via endovenosa, la via orale (sonda gastrica), inalatoria, intratracheale, o l'impianto. In ogni caso, deve essere scelta la via che garantisce un'adeguata esposizione del o dei tessuti bersaglio. L'iniezione intraperitoneale non è generalmente raccomandata in quanto non si tratta di una via di esposizione umana prevista, e va utilizzata solo con una specifica giustificazione scientifica. Se la sostanza chimica in esame è miscelata nell'alimentazione o nell'acqua occorre fare attenzione, specialmente nei casi di dosaggio singolo, che il lasso di tempo fra l'assunzione del cibo e dell'acqua e il campionamento sia sufficiente per consentire l'individuazione degli effetti (cfr. il paragrafo 37). Il volume massimo di liquido somministrabile in un'unica volta con sonda gastrica o con iniezione dipende dalle dimensioni dell'animale da laboratorio. Esso non deve generalmente essere superiore a 1 ml/100 g di peso corporeo, tranne nel caso delle soluzioni acquose che possono essere somministrate in quantità pari a massimo 2 ml/100 g di peso corporeo. L'uso di volumi maggiori deve essere giustificato. Salvo nel caso di sostanze chimiche irritanti o corrosive, i cui effetti di norma tendono a esacerbarsi con l'aumentare della concentrazione, la variabilità del volume somministrato deve essere ridotta al minimo adeguando la concentrazione, in modo da garantire la somministrazione di un volume costante in relazione al peso corporeo per tutti i livelli di dose.

▼M7

Programma di trattamento

Sono di preferenza effettuati 2 o più trattamenti, somministrati a intervalli di 24 ore, specialmente quando la prova viene integrata in altri studi di tossicità. Alternativamente, possono essere somministrati trattamenti singoli, se ciò è giustificato sul piano scientifico (ad es. qualora sia noto che le sostanze chimiche in esame bloccano il ciclo cellulare). Le sostanze chimiche in esame possono anche essere somministrate in prese frazionate, cioè due prese nello stesso giorno a distanza di qualche ora al massimo, per agevolare la somministrazione di un grosso volume. In queste situazioni, o in caso di somministrazione della sostanza chimica in esame per inalazione, il momento del campionamento deve essere programmato in base al momento di somministrazione dell'ultima dose o della fine dell'esposizione.

La prova può essere realizzata su topi o su ratti in uno dei tre seguenti modi:

a. Gli animali sono trattati una volta con la sostanza chimica in esame. I campioni del midollo osseo sono prelevati almeno due volte (da gruppi di animali indipendenti), cominciando non prima di 24 ore dopo il trattamento ma senza andare oltre le 48 ore dopo il trattamento, con adeguati intervalli fra i campioni, a meno che la sostanza chimica non sia nota per avere un tempo di dimezzamento eccezionalmente lungo. Se il prelievo è effettuato meno di 24 ore dopo la somministrazione occorre fornirne la ragione. Sono prelevati almeno due volte anche i campioni di sangue periferico (dallo stesso gruppo di animali), ad adeguati intervalli, cominciando non prima di 36 ore dopo il trattamento ma senza andare al di là delle 72 ore. Al momento del primo campionamento, tutti i gruppi di trattamento devono essere trattati e devono essere raccolti i campioni per l'analisi, mentre al momento del o dei campionamenti successivi deve essere somministrata solo la dose massima. Quando si ottiene una risposta positiva ad un momento del campionamento, non sono necessari prelievi supplementari a meno che non siano necessarie informazioni quantitative sulla relazione dose-risposta. I tempi di raccolta descritti sono una conseguenza della cinetica di comparsa e scomparsa dei micronuclei in questi 2 compartimenti tissutali.

b. Se si procede a 2 trattamenti giornalieri (per esempio due trattamenti a intervalli di 24 ore), i campioni vanno prelevati un'unica volta, fra le 18 e le 24 ore dopo l'ultimo trattamento per il midollo osseo e tra le 36 e le 48 ore dopo l'ultimo trattamento per il sangue periferico (30). I tempi di raccolta descritti sono una conseguenza della cinetica di comparsa e scomparsa dei micronuclei in questi 2 compartimenti tissutali.

c. Se si procede a tre o più trattamenti giornalieri (per esempio tre o più trattamenti ad intervalli di circa 24 ore), i campioni di midollo osseo devono essere prelevati non più tardi di 24 ore dopo l'ultimo trattamento e il sangue periferico non più tardi di 40 ore dopo l'ultimo trattamento (31). Questa opzione di trattamento permette di combinare il test della cometa (per esempio, campionamento 2-6 ore dopo l'ultima somministrazione) con il test del micronucleo, e di integrare il test del micronucleo con gli studi di tossicità a dosi ripetute. Dai dati disponibili emerge che, in caso di 3 o più trattamenti, su questi periodi più ampi può essere osservata l'induzione di micronuclei (15).

Qualora ciò sia pertinente e scientificamente giustificato, e per facilitare l'integrazione con altri test di tossicità, possono essere utilizzati altri regimi di dosaggio o di campionamento.

Osservazioni

Gli animali da laboratorio devono essere oggetto di osservazioni cliniche generali e i segni clinici devono essere registrati almeno una volta al giorno, preferibilmente alla stessa o alle stesse ore e tenendo conto del periodo di massima intensità degli effetti previsti dopo la somministrazione. Almeno due volte al giorno, durante il periodo di somministrazione, tutti gli animali vengono esaminati al fine di determinare la morbilità e la mortalità. Tutti gli animali devono essere pesati all'inizio della prova, almeno una volta alla settimana nel corso degli studi a dosi ripetute, e al momento della soppressione incruenta. Nelle prove la cui durata è di almeno una settimana, la misurazione del consumo di cibo va

▼M7

eseguita almeno con cadenza settimanale. Se la sostanza in esame viene somministrata con l'acqua, il consumo di acqua va misurato ad ogni cambio dell'acqua e almeno una volta alla settimana. Gli animali che manifestano segni di eccessiva, ma non letale, tossicità vanno soppressi in modo incruento prima della fine del periodo di saggio (28). In certe circostanze può essere controllata la temperatura corporea degli animali, poiché un'iper- o ipotermia indotta dal trattamento può falsare i risultati (32) (33) (34).

Esposizione del tessuto bersaglio

Ove ciò sia giustificato e non esistano altri dati sull'esposizione (cfr. il paragrafo 48), al o ai momenti idonei va prelevato un campione di sangue per esaminare i livelli delle sostanze chimiche in esame nel plasma, allo scopo di dimostrare l'avvenuta esposizione del midollo osseo).

Preparazione del midollo osseo / del sangue

Le cellule del midollo osseo vengono di solito prelevate dal femore o dalla tibia degli animali immediatamente dopo la soppressione incruenta. Generalmente le cellule sono prelevate, preparate e colorate secondo metodi prestabiliti. Conformemente alle norme pertinenti sul benessere degli animali possono essere ottenute piccole quantità di sangue periferico usando un metodo che permetta la sopravvivenza della cavia (come il prelievo dalla vena caudale o da altro vaso sanguigno adeguato), oppure tramite puntura cardiaca o prelievo da un vaso sanguigno principale dopo la soppressione incruenta. Sia per gli eritrociti ottenuti dal midollo osseo che per quelli ottenuti dal sangue periferico, a seconda del metodo di analisi, le cellule possono venire immediatamente sottoposte a un processo di colorazione sopravitale (16) (17) (18), vengono preparati strisci che sono poi colorati per l'analisi al microscopio, o fissati e opportunamente colorati per l'analisi citometrica a flusso. L'uso di un colorante specifico per il DNA [ad esempio, arancio di acridina (35) o Hoechst 33258 più pironina-Y (36)] può eliminare alcuni degli artefatti dovuti all'uso di un colorante non specifico per il DNA. Ciò non esclude l'uso di coloranti convenzionali (per esempio Giemsa per l'analisi microscopica). Si possono usare anche altri sistemi [per esempio colonne di cellulosa per la rimozione delle cellule nucleate (37) (38)], se ne è dimostrata la compatibilità con la preparazione dei campioni in laboratorio.

Qualora questi metodi siano applicabili, per individuare la natura dei micronuclei (cromosoma/frammento cromosomico) possono essere usati anticorpi anticinetocore (39), FISH con sonde di DNA pancentromerico (40), o marcatura in situ mediante primer specifici per DNA pancentromerico, unitamente a un'adeguata colorazione del DNA (41), per stabilire se il meccanismo di induzione di micronuclei è dovuto a un'attività clastogenica e/o aneugenica. Possono infine essere usati altri metodi per distinguere i clastogeni dagli aneugeni, purché sia stata dimostrata la loro efficacia.

Analisi (manuale e automatizzata)

Tutti i vetrini o i campioni per l'analisi, compresi quelli dei controlli positivi e negativi, devono essere codificati indipendentemente prima di ogni tipo di analisi, e devono essere randomizzati in modo che l'analista manuale non conosca le condizioni del trattamento; questa codificazione non è necessaria quando si usano sistemi di conteggio automatizzato che non si basano sull'esame visivo e non possono essere influenzati dall'operatore. Per ogni animale, la percentuale di eritrociti immaturi rispetto agli eritrociti totali (immaturi + maturi) è determinata contando un totale di almeno 500 eritrociti per il midollo osseo e 2 000 eritrociti per il sangue periferico (42). Per determinare l'incidenza degli eritrociti immaturi micronucleati devono essere esaminati almeno 4 000 eritrociti immaturi per animale (43). Se la banca dati dei controlli negativi storici indica che la frequenza di fondo media degli eritrociti immaturi micronucleati nel laboratorio di prova è <0,1 %, occorre prendere in considerazione l'opportunità di esaminare cellule supplementari. Quando si analizzano i campioni, la percentuale di eritrociti immaturi rispetto al numero totale di eritrociti negli animali trattati non deve essere inferiore al 20 % della proporzione verificata nel gruppo di controllo mezzo disperdente/solvente con l'analisi microscopica, e non deve essere inferiore al

▼M7

5 % circa della proporzione verificata nel gruppo di controllo mezzo disperdente/solvente con l'analisi citometrica e il conteggio degli eritrociti immaturi positivi al CD71+ (cfr. il paragrafo 31) (29). Ad esempio, per un saggio su midollo osseo con esame al microscopio, se la percentuale di controllo degli eritrociti immaturi nel midollo osseo è del 50 %, il limite superiore di tossicità equivarrebbe al 10 % di eritrociti immaturi.

Poiché la milza del ratto blocca e distrugge gli eritrociti micronucleati, per mantenere un'alta sensibilità delle analisi per l'esame del sangue periferico del ratto è preferibile limitare l'analisi degli eritrociti immaturi micronucleati alla frazione più giovane. Quando si utilizzano metodi di analisi automatizzata, questi eritrociti più immaturi possono essere individuati in base al loro contenuto elevato di RNA, o all'alto livello di recettori della transferrina (CD71+) espressi sulla loro superficie (31). Tuttavia, il raffronto diretto di vari metodi di colorazione ha mostrato che possono essere ottenuti risultati soddisfacenti con varie metodologie, compresa la colorazione classica con arancio di acridina (3) (4).

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

I dati relativi a ciascun animale vanno presentati sotto forma di tabella. Il numero degli eritrociti immaturi e degli eritrociti immaturi con micronuclei, nonché la percentuale degli eritrociti immaturi sul totale degli eritrociti, devono essere elencati separatamente per ciascun animale. Quando i topi sono trattati per 4 settimane o più, devono essere anche forniti, se raccolti, i dati sul numero e la percentuale degli eritrociti maturi micronucleati. Nella relazione devono anche figurare i dati riguardanti la tossicità animale e i segni clinici.

Criteri di accettabilità

L'accettabilità delle prove si basa sui seguenti criteri:

a. l'aggiunta dei dati sui controlli negativi paralleli alla banca dati di controlli storici del laboratorio è ritenuta accettabile (cfr. i paragrafi 15-18);

b. i controlli positivi paralleli o i controlli ai fini del conteggio devono indurre risposte compatibili con quelle ottenute dalle banche dati dei controlli positivi storici e devono produrre un aumento statisticamente significativo rispetto al controllo negativo parallelo (cfr. i paragrafi 24-25);

c. è stato analizzato il numero adeguato di dosi e cellule;

d. i criteri per la scelta della dose massima sono coerenti con quelli descritti ai paragrafi 30-33.

Valutazione e interpretazione dei risultati

A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è ritenuta chiaramente positiva se:

a. almeno uno dei gruppi di trattamento manifesta un aumento statisticamente significativo della frequenza degli eritrociti immaturi micronucleati rispetto al controllo negativo parallelo;

b. una valutazione con un test di tendenza adeguato mostra che tale aumento è correlato alla dose almeno per uno dei momenti del campionamento, e

c. uno o più risultati si situano al di fuori della distribuzione dei dati di controllo negativi storici (ad es. limiti del controllo al 95 % in base alla distribuzione di Poisson).

▼M7

Se in un particolare momento del campionamento viene esaminata solo la dose massima, la sostanza chimica in esame è ritenuta chiaramente positiva se vi è un aumento statisticamente significativo rispetto al controllo negativo parallelo, e i risultati sono al di fuori della distribuzione dei dati di controllo negativi storici (ad es. limiti del controllo al 95 % in base alla distribuzione di Poisson). Raccomandazioni relative agli appropriati metodi statistici figurano nella letteratura (44) (45) (46) (47). Quando si effettua un'analisi della relazione dose-risposta, devono essere analizzati almeno tre gruppi di trattamento trattati. Nei test statistici l'unità sperimentale deve essere l'animale. L'ottenimento di risultati positivi nel test del micronucleo indica che la sostanza chimica in esame induce la formazione di micronuclei, che sono il risultato di danni cromosomici o danni all'apparato mitotico degli eritroblasti nelle specie in esame. Nel caso in cui sia stata effettuata una prova per individuare i centromeri nei micronuclei, una sostanza chimica in esame che produca micronuclei contenenti centromeri (DNA centromerico o cinetocore, indicativi di un'intera perdita cromosomica) è da considerarsi aneugenica.

A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è ritenuta chiaramente negativa se in tutte le condizioni sperimentali esaminate:

a. nessuno dei gruppi di trattamento manifesta un aumento statisticamente significativo della frequenza degli eritrociti immaturi micronucleati rispetto al controllo negativo parallelo;

b. una valutazione con un test di tendenza adeguato mostra che in nessuno dei momenti del campionamento vi è un aumento correlato alla dose;

c. tutti i risultati si situano entro la distribuzione dei dati di controllo negativi storici (ad es. limiti del controllo al 95 % in base alla distribuzione di Poisson), e

d. l'esposizione del midollo osseo alla sostanza chimica in esame è effettivamente avvenuta.

Raccomandazioni relative ai metodi statistici più appropriati figurano nella letteratura (44) (45) (46) (47). L'esposizione del midollo osseo alla sostanza chimica in esame può essere dimostrata, ad esempio, da un calo del rapporto fra eritrociti immaturi e maturi, o dalla misurazione del livello delle sostanze in esame nel plasma o nel sangue In caso di somministrazione per via endovenosa, la prova dell'esposizione non è necessaria. In alternativa, l'esposizione del midollo osseo può essere dimostrata ricorrendo ai dati ADME, ottenuti nell'ambito di uno studio indipendente usando la stessa via di somministrazione e le stesse specie. L'ottenimento di risultati negativi indica che, nelle condizioni di prova, la sostanza chimica in esame non induce la formazione di micronuclei negli eritrociti immaturi delle specie utilizzate.

Non è necessario verificare una risposta chiaramente positiva o chiaramente negativa.

Nei casi in cui la risposta non sia chiaramente negativa né chiaramente positiva, per poter stabilire la rilevanza biologica di un risultato (ad es. un aumento debole o marginale), i dati devono venire sottoposti al giudizio di esperti e/o a indagini più approfondite sugli esperimenti portati a termine. In alcuni casi può essere utile analizzare più cellule o ripetere l'esperienza in condizioni sperimentali modificate.

In rari casi, anche dopo ulteriori indagini, i dati non permetteranno di concludere se la sostanza chimica in esame produce risultati positivi o negativi, e lo studio dovrà pertanto essere dichiarato ambiguo.

Relazione sulla prova

La relazione sulla prova deve comprendere le informazioni seguenti:

Sintesi

Sostanza chimica in esame:

— origine, numero di lotto e data di scadenza, se disponibile;

▼M7

— stabilità della sostanza chimica in esame, se nota.

Sostanza monocomponente:

— natura fisica, idrosolubilità, e altre proprietà fisico-chimiche rilevanti;

— identificazione chimica: nome IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula di struttura, purezza, identità chimica delle impurità, se del caso e realizzabile in pratica, ecc.

Sostanza multicomponente, sostanze UVCB e miscele:

— caratterizzate, nella misura del possibile, tramite l'identità chimica (cfr. supra), le proporzioni quantitative e le proprietà fisico-chimiche rilevanti dei componenti.

Preparazione della sostanza chimica in esame:

— motivazione della scelta del mezzo disperdente;

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se note;

— preparazione dei preparati per somministrazione via alimentare, con l'acqua da bere e per inalazione;

— determinazione analitica dei preparati (ad esempio, stabilità, omogeneità, concentrazioni nominali), se effettuata.

Animali da laboratorio:

— specie/ceppi usati e giustificazione dell'utilizzo;

— numero, età e sesso degli animali;

— origine, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.;

— metodo di identificazione univoca degli animali;

— per gli studi a breve termine: peso dei singoli animali all'inizio e alla fine del saggio; per gli studi di durata superiore a una settimana: peso individuale durante lo studio e consumo di cibo. Devono essere inclusi l'intervallo, la media e la deviazione standard per ciascun gruppo.

Condizioni di prova:

— dati relativi ai controlli positivi e negativi (mezzo disperdente/solvente);

— dati del test di *range-finding*, se effettuato;

— criteri di selezione delle dosi;

— dettagli della preparazione della sostanza chimica in esame;

— modalità precise di somministrazione della sostanza chimica in esame;

— criteri di scelta della via e della durata della somministrazione;

— metodi usati per verificare che la sostanza o le sostanze in esame siano entrate in circolo o abbiano raggiunto il tessuto bersaglio;

▼M7

— dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno) calcolata in funzione della concentrazione (ppm) della sostanza chimica in esame contenuta nella dieta/acqua da bere e del consumo, se del caso;

— dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua;

— metodo di soppressione incruenta;

— metodo di analgesia (se usato);

— descrizione dettagliata dello schema di trattamento e di campionamento e giustificazione delle scelte;

— metodi di preparazione dei vetrini;

— procedure di isolamento e conservazione dei campioni;

— metodi di misurazione della tossicità;

— criteri di conteggio degli eritrociti immaturi micronucleati;

— numero di cellule esaminate per ogni animale per determinare la frequenza degli eritrociti immaturi micronucleati e la percentuale degli eritrociti immaturi rispetto agli eritrociti maturi;

— criteri di accettabilità dello studio;

— metodi (come l'uso di anticorpi anticinetocore o di sonde di DNA centromero- specifiche) per determinare se i micronuclei contengono cromosomi interi o frammenti, se del caso.

Risultati:

— condizioni dell'animale prima e durante il periodo di saggio, compresi i segni di tossicità;

— percentuale degli eritrociti maturi rispetto al totale degli eritrociti;

— numero degli eritrociti immaturi micronucleati, indicato separatamente per ciascun animale;

— media ± deviazione standard degli eritrociti immaturi micronucleati per gruppo;

— relazione dose-risposta, ove possibile;

— analisi e metodi statistici applicati;

— dati dei controlli negativi e positivi paralleli con intervalli, medie e deviazioni standard;

— dati sui controlli negativi e positivi storici con intervalli, medie e deviazioni standard, e limiti del controllo al 95 % per la distribuzione, così come il periodo di tempo interessato e il numero di punti;

— dati comprovanti l'avvenuta esposizione del midollo osseo;

— dati di caratterizzazione indicanti se i micronuclei contengono cromosomi interi o frammenti, se del caso;

— criteri stabiliti ai fini di una risposta positiva o negativa.

▼M7

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

Riferimenti.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Hayashi, M. *et al*. (2007), in vivo erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 627/1, pp. 10-30.

(3) MacGregor, J.T. *et al*. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, Toxicology Sciences, Vol. 94/1, pp. 92-107.

(4) Dertinger, S.D. *et al*. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, Toxicological Sciences, Vol. 94/1, pp. 83-91.

(5) Dertinger, S.D. *et al*. (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing in vivo cytogenetic damage, Mutagenesis, Vol. 26/1, pp. 139-145.

(6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, Mutation Research, Vol. 370/1, pp. 65-73.

(7) Asano, N. *et al*. (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitally stained peripheral blood cells, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 404/1-2, pp. 149-154.

(8) Styles, J.A. *et al*. (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, Cytometry, Vol. 44/2, pp. 153-155.

(9) Heddle, J.A. (1973), A rapid in vivo test for chromosomal damage, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 18/2, pp. 187-190.

(10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, Mutation Research, Vol. 31/1, pp. 9-15.

(11) Heddle, J.A. *et al*. (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 123/1, pp. 61-118.

(12) Mavournin, K.H. *et al*. (1990), The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 239/1, pp. 29-80.

(13) MacGregor, J.T. *et al*. (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, Developments in Toxicology Environmental Science, Vol. 11, pp. 555-558.

▼M7

(14) MacGregor, J.T. *et al*. (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 189/2, pp. 103-112.

(15) MacGregor, J.T. *et al*. (1990), The in vivo erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, Fundamental and Applied Toxicology, Vol. 14/3, pp. 513-522.

(16) Hayashi, M. *et al*. (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, Mutation Research/ Genetic Toxicology, Vol. 245/4, pp. 245-249.

(17) CSGMT/JEMS.MMS — The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 278/2-3, pp. 83-98.

(18) CSGMT/JEMS.MMS — The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), Mutagenesis, Vol. 10/3, pp. 153-159.

(19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 23/4, pp. 239-273.

(20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 453/1, pp. 45-50.

(21) Hayes, J. *et al*. (2009), The rat bone marrow micronucleus test–study design and statistical power, Mutagenesis, Vol. 24/5, pp. 419-424.

(22) Wakata, A. *et al*. (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 32/1, pp. 84-100.

(23) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(24) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(25) Rothfuss, A. *et al*. (2011), Improvement of in vivo genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 108-120.

(26) Hayashi, M. *et al*. (1994), in vivo rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.

(27) Fielder, R.J. *et al*. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in in vivo mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.

▼M7

(28) OECD (2000), «Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(29) LeBaron, M.J. *et al*. (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 54/3, pp. 222-228.

(30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, Vol. 10/4, pp. 313-319.

(31) Hayashi, M. *et al*. (2000), in vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 35/3, pp. 234-252.

(32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 390/1-2, pp. 79-83.

(33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 413/1, pp. 7-14.

(34) Spencer, P.J. *et al*. (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, Toxicological Sciences, Vol. 97/1, pp. 120-127.

(35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Research Letters, Vol. 120/4, pp. 241-247.

(36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, Mutation Research, Vol. 120/4, pp. 269-275.

(37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 213/1, pp. 91-104.

(38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, Mutation Research, Vol. 439/1, pp. 121-126.

(39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced in vivo, Mutagenesis, Vol. 5/4, pp. 411-415.

(40) Miller, B.M. *et al*. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, Vol. 6/4, pp. 297-302.

(41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, American Journal of Medical Genetics, Vol. 107/2, pp. 99-104.

(42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, Mutation Research, Vol. 347/2, pp. 97-99.

(43) OECD (2014), «Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

▼**M7**

(44) Richold, M. *et al*. (1990), «In Vivo Cytogenetics Assays», in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

(45) Lovell, D.P. *et al*. (1989), «Statistical Analysis of in vivo Cytogenetic Assays», in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

(46) Hayashi, M. *et al*. (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, Environmental Health Perspectives, Vol. 102/Suppl 1, pp. 49-52.

(47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of in vivo rodent micronucleus assay, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 469/2, pp. 233-241.

▼M7

Appendice 1

DEFINIZIONI

Centromero: regione/i di un cromosoma sede di attacco del fuso durante la divisione cellulare, che permette il corretto movimento dei cromosomi figli verso i poli delle cellule figlie.

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

Eritroblasto: stadio precoce dello sviluppo di un eritrocita, immediatamente precedente la formazione dell'eritrocita immaturo, quando la cellula contiene ancora il nucleo.

Cinetocore: struttura proteica che si forma sul centromero delle cellule eucariotiche, che collega il cromosoma ai polimeri microtubolari del fuso mitotico durante la mitosi e la meiosi, e che durante la divisione cellulare serve a separare i cromatidi fratelli.

Micronuclei: piccoli nuclei, distinti e soprannumerari rispetto al nucleo principale delle cellule, prodotti durante la telofase della mitosi (meiosi) da frammenti residui di cromosomi o da cromosomi interi.

Eritrocita normocromatico o maturo: un eritrocita completamente maturo che ha perso l'RNA residuo che rimane dopo l'enucleazione e/o ha perso altri marcatori cellulari a ciclo vitale breve che generalmente scompaiono a seguito dell'enucleazione, dopo la divisione finale dell'eritroblasto.

Eritrocita policromatico o immaturo: eritrocita di nuova formazione, a uno stadio di sviluppo intermedio, che reagisce alle componenti blu e rosse dei coloranti classici del sangue, come la colorazione di Wright-Giemsa, in virtù della presenza di RNA residuo nella cellula di nuova formazione. Queste cellule di nuova formazione sono praticamente quasi identiche ai reticolociti, visualizzabili usando una colorazione vitale che fa precipitare in un «reticolo» l'RNA residuo. Altri metodi, compresa la colorazione monocromatica dell'RNA con colorante fluorescente o l'evidenziazione dei marcatori di superficie a vita breve come il CD71 con anticorpi fluorescenti, sono ora spesso usati per individuare gli eritrociti di nuova formazione. Gli eritrociti policromatici, i reticolociti, e gli eritrociti positivi al marcatore CD71 sono tutti eritrociti immaturi, ciascuno corrispondente a uno stadio di sviluppo leggermente diverso.

Reticolocito: eritrocita di nuova formazione. L'RNA cellulare residuo precipita sotto forma di un caratteristico «reticolo», evidenziabile con un colorante vitale. Nei reticolociti e negli eritrociti policromatici l'età cellulare ha una distribuzione simile.

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

▼M7

Appendice 2

METODO FATTORIALE PER INDIVIDUARE LE DIFFERENZE FRA I SESSI NEL SAGGIO IN VIVO DEL MICRONUCLEO

Metodo fattoriale e analisi

Questo modello prevede di esporre 5 maschi e 5 femmine a ciascuna concentrazione sperimentale e comporta pertanto l'utilizzo di un minimo di 40 animali (20 maschi e 20 femmine più i relativi controlli positivi).

Il modello qui presentato — una delle forme semplici del modello fattoriale — è equivalente a un'analisi della varianza a due fattori, in cui il sesso e il livello delle concentrazioni costituiscono i fattori principali. I dati possono essere analizzati utilizzando diversi programmi statistici standard, quali SPSS, SAS, STATA, Genstat o il programma R.

A partire dall'insieme dei dati si determina la variabilità tra i sessi e le concentrazioni, nonché la variabilità relativa alle interazioni tra sessi e concentrazioni. Ciascuno di questi aspetti è quindi valutato in rapporto alla stima della variabilità tra gli animali ripartiti nei gruppi di animali dello stesso sesso esposti alle stesse concentrazioni. Maggiori informazioni su questa metodologia sono reperibili in diversi manuali standard di statistica (cfr. bibliografia), nonché nelle schede «di aiuto» fornite con i programmi statistici.

In seguito viene esaminata l'interazione sesso x concentrazione in una tabella ANOVA ([1]). In assenza di un termine di interazione significativo la combinazione dei valori inter-sessi o inter-livelli di concentrazione consente di effettuare test statistici validi tra i livelli, basandosi sul termine di variabilità intra-gruppo combinata di 'ANOVA.

L'analisi prosegue suddividendo la variabilità stimata tra le concentrazioni in modo da ottenere contrasti che permettano di stabilire contrasti lineari e quadratici delle risposte per l'insieme dei livelli di concentrazione. Quando si riscontra un'interazione significativa sesso x concentrazione, questo termine può essere a sua volta in ripartito in contrasti di interazione lineare x sesso e quadratica x sesso. In questo modo si può verificare se le risposte alle concentrazioni sono parallele per i due sessi o se vi è una differenza riconducibile al sesso.

La stima della variabilità intra-gruppo combinata può essere utilizzata per verificare lo scarto tra le medie, confrontandole due a due. I confronti possono essere effettuati tra le medie per i due sessi e tra le medie dei diversi livelli delle concentrazioni (come, ad esempio, confronti tra i livelli dei controlli negativi). Nei casi in cui si registra un'interazione significativa i confronti possono essere effettuati tra le medie di concentrazioni diverse per lo stesso sesso o tra le medie dei due sessi a parità di concentrazione.

Riferimenti

Numerosi manuali di statistica esaminano la teoria, la concezione, la metodologia, l'analisi e l'interpretazione dei modelli fattoriali, dall'analisi più semplice, a due fattori, alle forme più complesse utilizzate per la metodologia *Design of Experiment*. Di seguito ne è riportato un elenco non completo. Alcuni manuali forniscono esempi di modelli comparabili e, in alcuni casi, forniscono un codice che permette di effettuare l'analisi utilizzando diversi programmi.

([1]) Gli statistici che applicano una metodologia di modellizzazione quale l'utilizzo dei modelli lineari generalizzati (GLM) possono effettuare l'analisi in modo diverso ma comparabile, senza tuttavia ricavare necessariamente la tradizionale tabella ANOVA che risale a concetti algoritmici del calcolo statistico elaborati in epoca preinformatica.

▼M7

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼B

B.13/14. **MUTAGENICITÀ — TEST DI REVERSIONE SU BATTERI**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼M7

_____

_____

▼**M8**

B.17 **PROVA *IN VITRO* DI MUTAZIONE GENICA SU CELLULE DI MAMMIFERO NEI GENI HPRT E XPRT**

▼**M9**

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼**M7**

_____

_____

_____

▼B

B.21. **SAGGIO IN VITRO DI TRASFORMAZIONE DI CELLULE DI MAMMIFERO**

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPI DEL METODO DI SAGGIO

Per la rilevazione di cambiamenti fenotipici in vitro indotti da sostanze chimiche associate con una trasformazione maligna *in vivo* può essere fatto uso di sistemi di coltura di cellule di mammiferi. Fra le cellule più largamente usate figurano le cellule C3H10T$^{1}/_{2}$, 3T3, SHE, le cellule di ratto Fisher; i saggi si fondano su cambiamenti della morfologia cellulare, sulla formazione di foci e sulla perdita della dipendenza da ancoraggio in agar semisolido. Esistono anche altri sistemi meno largamente usati i quali mettono in luce altri tipi di cambiamenti fisiologici o morfologici nelle cellule successivamente all'esposizione a sostanze chimiche carcinogene. Nessuno degli eventi finali dei test in vitro ha un legame meccanicistico accertato con il cancro. Alcuni fra i saggi sono in grado di evidenziare agenti promotori dei tumori. La citotossicità può essere determinata attraverso la misura dell'effetto della sostanza in esame sulla capacità di formazione di colonie (efficienza di clonaggio) o sul tasso di crescita delle colture. La misurazione della citotossicità ha lo scopo di stabilire se l'esposizione alla sostanza in esame abbia avuto carattere rilevante dal punto di vista tossicologico, ma non può essere usata per calcolare la frequenza della trasformazione in tutti i saggi poiché alcuni di essi possono comportare un'incubazione prolungata e/o un ripiastramento delle cellule.

1.5. CRITERI QUALITATIVI

Nessuno.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

Preparazioni

Cellule

È disponibile tutta una varietà di linee cellulari o di cellule primarie, in relazione al saggio di trasformazione che si intende effettuare. Il ricercatore deve accertarsi che nel saggio che si sta effettuando le cellule presentino dopo esposizione a carcinogeni noti l'appropriato cambiamento fenotipico, e che il saggio nel suo laboratorio sia di provata e documentata validità e attendibilità.

Terreni di coltura

Devono essere usati terreni di coltura e condizioni sperimentali appropriati per il saggio di trasformazione che si effettua.

▼B

Sostanza in esame

Le sostanze in esame possono essere preparate in mezzi di coltura ovvero disciolte o poste in sospensione in veicoli appropriati, prima del trattamento delle cellule. La concentrazione finale del veicolo nel sistema di coltura non deve influire sulla vitalità o sul tasso di crescita delle cellule né sull'incidenza della trasformazione.

Attivazione metabolica

Le cellule vanno esposte alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un sistema esogeno di attivazione metabolica dei mammiferi. Alternativamente, quando sia fatto uso di tipi di cellule che possiedono un'attività metabolica endogena deve essere accertato che la natura dell'attività stessa sia appropriata per la classe chimica sottoposta all'esame.

Condizioni sperimentali

Uso di controlli positivi e negativi

È opportuno includere in ciascun esperimento dei controlli positivi, con impiego sia di un composto ad azione diretta che di un composto richiedente attivazione metabolica; è altresì opportuno fare uso di un controllo negativo (del solvente).

Quali esempi di sostanze che si prestano ad essere usate come controlli positivi si possono citare:

— sostanze ad azione diretta:

  — etilmetansulfonato,

  — β-propiolattone;

— composti richiedenti un'attivazione metabolica:

  — 2-acetilaminofluorene,

  — 4-dimetilaminoazobenzene,

  — 7,12-dimetilbenzantracene.

Se del caso, è opportuno includere un controllo positivo supplementare della medesima classe chimica del composto in esame.

Concentrazioni

È opportuno usare varie concentrazioni della sostanza in esame. Dette concentrazioni devono dar luogo ad un effetto tossico correlato con la concentrazione, nel senso che la concentrazione più elevata produce un livello ridotto di sopravvivenza, mentre alla concentrazione più bassa la sopravvivenza è approssimativamente dello stesso ordine che nel controllo negativo. Le sostanze relativamente insolubili in acqua vanno saggiate fino al loro limite di solubilità secondo procedure appropriate. Per le sostanze non tossiche altamente solubili in acqua la concentrazione massima della sostanza va determinata caso per caso.

▼B

Procedimento

L'esposizione delle cellule deve avere una durata appropriata in relazione al sistema di saggio adottato, e questo, quando l'esposizione è prolungata, può comportare un ridosaggio con cambio del mezzo e, se necessario, con miscela di attivazione metabolica fresca. Le cellule non aventi un'attività metabolica endogena sufficiente vanno esposte alla sostanza in esame sia in presenza che in assenza di un sistema di attivazione metabolica appropriato. Al termine del periodo di esposizione le cellule vengono lavate da ogni traccia della sostanza in esame e coltivate in condizioni appropriate per la comparsa del fenotipo trasformato che si sta studiando, e viene infine determinata l'incidenza della trasformazione. Tutti i risultati devono essere confermati in un esperimento indipendente.

2. **DATI**

I dati vanno presentati in forma di tabella e possono assumere forme diverse a seconda del tipo di determinazione effettuato, ad esempio numero di foci o di colonie per piastre, piastre positive o numero delle cellule trasformate. La sopravvivenza va espressa quale percentuale dei livelli di controllo, e la frequenza della trasformazione sotto forma del numero di trasformanti in relazione al numero dei sopravvissuti. I dati devono essere valutati secondo metodi statistici appropriati.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— tipo di cellule usato, numero delle colture cellulari, metodi di mantenimento delle colture,

— condizioni di effettuazione del saggio, concentrazione della sostanza in esame, veicolo usato, temperatura di incubazione, durata dell'incubazione, durata e frequenza del trattamento, densità delle cellule durante il trattamento, tipo di sistema di attivazione metabolica esogena usato, controlli positivi e negativi, specificazione del fenotipo studiato, sistema selettivo usato (se del caso), criteri per la scelta delle dosi,

— metodo seguito per l'enumerazione delle cellule vitali e delle cellule trasformate,

— valutazione statistica,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. VALUTAZIONE ED INTERPRETAZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

▼M8

B.22 SAGGIO DI LETALITÀ DOMINANTE NEI RODITORI

▼M9

Questo metodo di prova è stato soppresso in quanto non è più riconosciuto come idoneo per acquisire informazioni sulle proprietà tossicologiche delle sostanze chimiche ai fini del regolamento (CE) n. 1907/2006. I metodi di prova applicabili per l'endpoint in questione figurano nella tabella 2 della parte 0.

▼M8

B.23 SAGGIO DI ABERRAZIONE CROMOSOMICA SUGLI SPERMATOGONI DI MAMMIFERO

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 483 (2016). I metodi di prova vengono periodicamente rivisti alla luce dei progressi scientifici, delle mutevoli esigenze in materia di regolamentazione nonché di considerazioni relative al benessere degli animali. La presente versione modificata del metodo di prova riflette molti anni di esperienza con questo saggio e tiene conto delle possibilità di integrare o combinare questa prova con altri studi di tossicità o genotossicità; Combinare diversi studi di tossicità permetterebbe, potenzialmente, di ridurre il numero di animali usati nelle prove di tossicità. Il presente metodo di prova è parte integrante di una serie di metodi di prova sulla tossicologia genetica. L'OCSE ha elaborato un documento contenente informazioni succinte sulle prove di tossicologia genetica e un compendio delle modifiche recentemente apportate alle linee guida dell'OCSE in tale materia (1).

2. Il saggio *in vivo* di aberrazione cromosomica sugli spermatogoni di mammifero è destinato ad identificare le sostanze chimiche che causano aberrazioni cromosomiche strutturali nelle cellule spermatogoniali di mammifero (2) (3) (4). Questa prova è inoltre rilevante per valutare la genotossicità. Difatti, benché possano variare a seconda delle specie, i fattori del metabolismo *in vivo*, gli aspetti farmacocinetici e i processi di riparazione del DNA sono attivi e contribuiscono alle risposte. Questo metodo di prova non è stato elaborato per misurare le aberrazioni numeriche e non è comunemente usato per questo scopo.

3. Questo metodo di prova misura le aberrazioni cromosomiche strutturali (di tipo cromosomico e cromatidico) nella divisione degli spermatogoni e pertanto dovrebbe permettere di prevedere l'induzione di mutazioni ereditabili in tali cellule germinali.

4. Le definizioni dei termini fondamentali figurano nell'appendice.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

5. Nel presente metodo di prova si usano generalmente roditori, ma in certi casi si può ricorrere anche ad altre specie se ciò è giustificato sul piano scientifico. Le preparazioni citogenetiche standard di testicoli di roditori generano metafasi mitotiche (spermatogoni) e meiotiche (spermatociti). Le metafasi mitotiche e meiotiche sono identificate in base alla morfologia dei cromosomi (4). La prova citogenetica *in vivo* rivela aberrazioni cromosomiche strutturali nelle mitosi degli spermatogoni. Altre cellule bersaglio non sono oggetto del presente metodo di prova.

6. Per rilevare aberrazioni di tipo cromatidico negli spermatogoni, è necessario esaminare la prima divisione cellulare mitotica dopo il trattamento, prima che tali aberrazioni evolvano in aberrazioni di tipo cromosomico nelle successive divisioni cellulari. L'analisi dei cromosomi allo stadio della meiosi, per individuare aberrazioni cromosomiche strutturali allo stadio della diacinesi-metafase I e metafase II può fornire ulteriori informazioni sugli spermatociti trattati.

▼M8

7. I testicoli contengono diverse generazioni di spermatogoni (5). Questi diversi tipi di cellule germinali possono presentare sensibilità diverse al trattamento chimico. Le aberrazioni individuate rappresentano pertanto una risposta aggregata delle popolazioni di cellule spermatogoniali trattate. La maggioranza delle cellule mitotiche nelle preparazioni di testicoli consiste in spermatogoni di tipo B, il cui un ciclo cellulare è di circa 26 ore (3).

8. Se è comprovato che la sostanza chimica in esame o i relativi metaboliti non raggiungono i testicoli, non è opportuno utilizzare questa prova.

PRINCIPIO DELLA PROVA

9. Generalmente gli animali sono esposti alla sostanza chimica in esame attraverso un'adeguata via d'esposizione, e al momento opportuno, dopo il trattamento, sono soppressi in maniera incruenta. Prima della soppressione incruenta, gli animali sono trattati con un inibitore della metafase (ad esempio colchicina o Colcemid®). Le preparazioni cromosomiche approntate dalle cellule germinali sono poi sottoposte a un processo di colorazione, e le cellule in metafase sono analizzate per individuare aberrazioni cromosomiche.

VERIFICA DELLA COMPETENZA DEL LABORATORIO

10. La competenza sperimentale ad eseguire il presente metodo di prova è provata dimostrando la competenza a riprodurre i risultati attesi delle frequenze di aberrazioni cromosomiche strutturali negli spermatogoni con sostanze chimiche utilizzate come sostanze di controllo positivo (incluse le risposte deboli), quali quelle elencate alla tabella 1 e ottenendo frequenze di controllo negative coerenti con la serie di dati accettabile di dati di controllo riportati dalla letteratura pubblicata (ad esempio (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)) o, se disponibile, con la distribuzione dei controlli storici del laboratorio.

DESCRIZIONE DEL METODO

Preparazioni

Selezione delle specie animali

11. Di preferenza sono utilizzati individui adulti, giovani e in buona salute, provenienti da ceppi di animali da laboratorio. Generalmente si usano topi maschi; tuttavia, qualora ciò sia scientificamente giustificato, e per consentire la combinazione con un'altra prova, possono essere utilizzati maschi di altre specie idonee di mammiferi. L'utilizzazione di specie diverse dai roditori deve essere scientificamente giustificata nella relazione.

Condizioni di stabulazione e alimentazione degli animali

12. Per i roditori, la temperatura dello stabulario deve essere mantenuta a 22 °C (± 3 °C). Idealmente l'umidità relativa deve essere del 50-60 %. Deve comunque essere come minimo del 40 % e non deve preferibilmente superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 di oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua da bere. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di garantire un'adeguata miscela della sostanza in esame, se somministrata per questa via. Se non ci si aspetta alcun comportamento aggressivo i roditori vanno alloggiati in piccoli gruppi (non più di cinque in ogni gabbia), preferibilmente in gabbie a fondo pieno con adeguato arricchimento ambientale. Gli animali possono essere stabulati individualmente se ciò è giustificato dal punto di vista scientifico.

▼M8

Preparazione degli animali

13. Sono generalmente utilizzati animali maschi adulti, giovani e sani (età 8-12 settimane all'inizio del trattamento), che vengono suddivisi a caso in gruppi di controllo e di trattamento. Ciascun animale è identificato in modo univoco applicando un metodo incruento e il meno possibile invasivo (cioè inanellamento, etichettatura, applicazione di un microchip o identificazione biometrica, evitando il taglio delle orecchie o la falangectomia) e deve essere acclimatato alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Deve essere evitata ogni contaminazione incrociata fra il controllo positivo e la sostanza chimica in esame. All'inizio dello studio le variazioni di peso tra gli animali devono essere minime e non superare ± 20 %.

Preparazione delle dosi

14. Le sostanze chimiche in esame solide vanno sciolte o poste in sospensione in appropriati solventi o mezzi disperdenti o mescolate alla dieta o all'acqua da bere prima di essere somministrate agli animali. Le sostanze chimiche in esame liquide possono essere somministrate direttamente o diluite prima della somministrazione. In caso di esposizione per via inalatoria, le sostanze possono essere somministrate sotto forma di gas, vapore o aerosol solido o liquido, in funzione delle loro proprietà fisico-chimiche. Le preparazioni della sostanza chimica in esame devono essere predisposte sul momento a meno di non disporre di dati che dimostrino la stabilità delle preparazioni in condizioni di stoccaggio e permettano di definire tali condizioni in modo adeguato.

Condizioni di prova - Solvente/mezzo disperdente

15. Il solvente/mezzo disperdente non deve produrre effetti tossici ai livelli di dose usati e non deve poter reagire chimicamente con la sostanza in esame. L'uso di solventi/mezzi disperdenti poco noti è ammesso solo se suffragato da dati che ne provino la compatibilità. Se possibile si raccomanda di considerare in primo luogo l'uso di un solvente/mezzo disperdente acquoso. Fra gli esempi di solventi/mezzi disperdenti compatibili e comunemente usati si possono menzionare l'acqua, la soluzione fisiologica, la soluzione di metilcellulosa, la soluzione di carbossimetilcellulosa sodica, l'olio di oliva e l'olio di mais. In mancanza di dati sui controlli storici o pubblicati che dimostrino che un solvente/mezzo disperdente atipico prescelto non induce aberrazioni cromosomiche strutturali e altri effetti nocivi, va effettuato uno studio iniziale per stabilire l'accettabilità del controllo contenente il solvente/mezzo disperdente.

Controlli positivi

16. Vanno sempre utilizzati animali come controlli positivi concomitanti, purché il laboratorio abbia dimostrato la propria competenza nell'effettuare la prova e abbia di recente (ad es. negli ultimi 5 anni) usato la prova periodicamente. Quando manca un gruppo di controllo positivo concomitante, in ogni esperimento devono essere inclusi controlli del conteggio (vetrini fissati e non colorati). Questo può avvenire includendo nel conteggio dello studio campioni di riferimento idonei ottenuti e conservati in occasione di un esperimento separato di controllo positivo svolto periodicamente (ad esempio ogni 6-18 mesi) nel laboratorio in cui è condotta la prova; ad esempio, durante la dimostrazione della competenza del laboratorio e successivamente con cadenza periodica, se necessario.

17. Le sostanze chimiche per i controlli positivi devono produrre, in modo affidabile, un aumento individuabile della frequenza delle cellule con aberrazioni cromosomiche strutturali rispetto al livello spontaneo. Le dosi dei controlli positivi devono essere scelte in modo che gli effetti siano chiari ma non rivelino immediatamente all'analista l'identità dei campioni codificati. Nella tabella 1 figurano esempi di sostanze per i controlli positivi.

▼M8

Tabella 1

Esempi di sostanze da utilizzare per i controlli positivi

Sostanze chimiche [n. CAS] (n. di riferimento)
Ciclofosfamide (monoidrato) [n. CAS 50-18-0 (n. CAS 6055-19-2)] (9)
Cicloesilammina [n. CAS 108-91-8] (7)
Mitomicina C [n. CAS 50-07-7] (6)
Acrilammide monomerico [79-06-1] (10)
Trietilenmelammina [n. CAS 51-18-3] (8)

Controlli negativi

18. In ciascun momento di campionamento si includono animali che fungono da controllo negativo; a tali animali viene somministrato il solo solvente o mezzo disperdente e sono altrimenti trattati nello stesso modo dei gruppi di trattamento. In mancanza di dati sui controlli storici o pubblicati che dimostrino che un solvente/mezzo disperdente prescelto non induce aberrazioni cromosomiche o altri effetti nocivi, in ciascun momento di campionamento si includono animali di controllo non trattati per stabilire l'accettabilità del controllo contenente il mezzo disperdente di controllo.

PROCEDURA

Numero di animali

19. All'inizio dello studio, la dimensione stabilita del gruppo deve consentire di disporre, in ogni gruppo, di almeno 5 animali maschi. Questo numero di animali per gruppo è ritenuto sufficiente per fornire una potenza statistica sufficiente (ossia per osservare almeno un raddoppiamento della frequenza delle aberrazioni cromosomiche se il livello dei controlli negativi è pari a 1,0 % o superiore, con l'80 % di probabilità a un livello di significatività dello 0,05) (3) (11). A titolo di orientamento sul numero massimo di animali generalmente necessario, uno studio che prevede due momenti di campionamento e coinvolge tre gruppi di trattamento e un gruppo di controllo negativo concomitante, più un gruppo di controllo positivo (ogni gruppo composto da cinque animali dello stesso sesso) richiederebbe 45 animali.

Programma di trattamento

20. Le sostanze chimiche in esame vengono in generale somministrate un'unica volta (ossia come trattamento singolo). È possibile impiegare altri protocolli di trattamento, purché siano scientificamente giustificati.

21. Dopo il trattamento si procede al prelievo di due campioni nel gruppo cui è stata somministrata la dose massima. Poiché il tempo necessario affinché la sostanza o le sostanze chimiche in esame siano assorbite e metabolizzate e producano effetti sulla cinetica del ciclo cellulare può influire sul momento ottimale per l'individuazione delle aberrazioni cromosomiche, sono effettuati due campionamenti, uno precoce e uno tardivo, rispettivamente circa 24 e 48 ore dopo il trattamento. Per dosi diverse dalla dose massima è opportuno procedere al campionamento precoce di 24 ore (inferiore o uguale al ciclo cellulare degli spermatogoni di tipo B, ottimizzando così la probabilità di conteggiare le prime metafasi post-trattamento) dopo il trattamento, salvo sia noto che il campionamento in un momento diverso risulterebbe giustificato e più idoneo all'individuazione degli effetti.

22. Si possono usare ulteriori momenti di campionamento. Ad esempio nel caso di sostanze chimiche che producono effetti indipendenti dalla fase S, possono essere idonei tempi di campionamento più precoci (ossia meno di 24 ore).

▼M8

23. Si può usare un regime di trattamento a dosi ripetute, ad esempio nel caso in cui la prova sia effettuata congiuntamente ad una prova su un endpoint diverso il cui periodo di somministrazione è di 28 giorni (ad esempio TM B.58); sono allora necessari gruppi aggiuntivi di animali al fine di tener conto dei diversi tempi di campionamento. Conseguentemente, l'idoneità di un siffatto programma deve essere giustificata sul piano scientifico e valutata caso per caso.

24. Prima della soppressione incruenta, agli animali si inietta per via intraperitoneale una dose adeguata di un inibitore della metafase (ad esempio Colcemid® o colchicina). Gli animali sono quindi campionati dopo un adeguato lasso di tempo. Per i topi e i ratti tale intervallo è di circa 3-5 ore.

Livelli di dose

25. Qualora venga effettuato uno studio preliminare per determinare l'intervallo delle dosi da somministrare, in quanto non sono disponibili dati adeguati da studi pertinenti che forniscano un orientamento in tal senso, tale studio deve essere effettuato nello stesso laboratorio, utilizzando specie, ceppi e regime di trattamento identici a quelli da utilizzare nello studio principale sulla base delle metodologie attualmente in uso per gli studi volti a determinare l'intervallo di concentrazione delle dosi (12). Lo studio deve essere finalizzato a individuare la dose massima tollerata (DMT), definita come la dose che provoca lievi effetti tossici in relazione alla durata dello studio (ad esempio, reazioni o comportamenti anormali, perdita di peso moderata o citotossicità del sistema ematopoietico), ma che non provoca la morte dell'animale o segni di dolore e sofferenza tali da renderne necessaria la soppressione (13).

26. La dose massima può essere definita anche come dose che produce qualche segno di tossicità negli spermatogoni (ad esempio una riduzione del rapporto tra cellule degli spermatogoni in mitosi e le cellule che si trovano nella prima e seconda metafase meiotica). Tale riduzione non deve superare il 50 %.

27. Le sostanze chimiche in esame con azione biologica specifica a dosi basse non tossiche (come ormoni e mitogeni) e le sostanze chimiche che presentano saturazione delle proprietà tossicocinetiche possono costituire eccezioni rispetto ai criteri di determinazione delle dosi e vanno valutate caso per caso.

28. Per ottenere informazioni sulla relazione dose-risposta, uno studio completo deve includere un gruppo di controllo negativo (paragrafo 18) e almeno tre livelli di dose, generalmente separati da un fattore 2, ma non superiore a 4. Se la sostanza chimica in esame non provoca alcuna tossicità nell'ambito di un *test di range-finding* o secondo quanto emerge dai dati esistenti, la dose massima per una singola somministrazione deve essere di 2 000 mg/kg di peso corporeo. Per contro, se la sostanza chimica in esame provoca tossicità, la MTD deve corrispondere alla dose più elevata somministrata, e i livelli di dose utilizzati devono essere compresi in un intervallo che va dalla tossicità massima a una tossicità modica o assente. Quando una tossicità del tessuto bersaglio (ad esempio i testicoli) è osservata a tutti i livelli di dose, è consigliabile un ulteriore studio con dosi non tossiche. Gli studi volti a descrivere più pienamente le informazioni quantitative sulla relazione dose-risposta possono richiedere gruppi di trattamento supplementari. Per certi tipi di sostanze chimiche in esame (ad esempio medicinali per uso umano) per le quali valgono specifici requisiti, i limiti possono variare. Se la sostanza chimica in esame produce effetti tossici, si seleziona la dose limite più due dosi inferiori (come sopra descritto). Per un periodo di somministrazione di 14 giorni o più, la dose limite è 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno e per periodi di somministrazione inferiori a 14 giorni la dose limite è di 2 000 mg/kg di peso corporeo/giorno.

▼M8

Somministrazione delle dosi

29. Nella concezione di un saggio va considerata la via d'esposizione umana prevista. Pertanto possono essere scelte, se giustificate, vie di somministrazione quali l'alimentazione, l'acqua potabile, la via sottocutanea locale, la via endovenosa, la via orale (sonda gastrica), inalatoria o l'impianto. In ogni caso, si deve optare per la via che garantisce un'adeguata esposizione del tessuto bersaglio. Le iniezioni intraperitoneali non sono in genere raccomandate in quanto non costituiscono una via di esposizione umana fisiologica mente rilevante, a meno che ciò non risulti scientificamente giustificato. Se la sostanza chimica in esame è miscelata nell'alimentazione o nell'acqua occorre fare attenzione, specialmente nei casi di dosaggio singolo, che il lasso di tempo fra l'assunzione del cibo e dell'acqua e il campionamento sia sufficiente per consentire l'individuazione degli effetti (cfr. il paragrafo 33). Il volume massimo di liquido somministrabile in una sola volta con sonda gastrica o con iniezione dipende dalle dimensioni dell'animale da laboratorio. Esso non deve generalmente essere superiore a 1 ml/100 g di peso corporeo, tranne nel caso delle soluzioni acquose che possono essere somministrate in quantità pari a massimo 2 ml/100 g di peso corporeo. L'uso di volumi maggiori (se consentito dalla legislazione in materia di benessere degli animali) deve essere giustificato. La variabilità del volume somministrato deve essere ridotta al minimo adeguando la concentrazione, in modo da garantire la somministrazione di un volume costante in relazione al peso corporeo per tutti i livelli di dose.

Osservazioni

30. Gli animali sperimentali devono essere oggetto di osservazioni cliniche generali e i segni clinici devono essere registrati almeno una volta al giorno, preferibilmente alla stessa o alle stesse ore e tenendo conto del periodo di massima intensità degli effetti previsti dopo la somministrazione. Almeno due volte al giorno, tutti gli animali vengono esaminati al fine di determinarne la morbilità e la mortalità. Tutti gli animali devono essere pesati all'inizio dello studio, almeno una volta alla settimana nel corso degli studi a dosi ripetute, e al momento della soppressione incruenta. Nelle prove la cui durata è di almeno una settimana, la misurazione del consumo di cibo va eseguita almeno con cadenza settimanale. Se la sostanza chimica in esame è diluita in acqua prima di essere somministrata, il consumo di acqua va misurato ad ogni cambio dell'acqua e almeno una volta alla settimana. Gli animali che manifestano segni di tossicità eccessiva ma non letale vanno soppressi in maniera incruenta prima del completamento del metodo di prova (13).

Preparazione dei cromosomi

31. Le sospensioni di cellule germinali ottenute da uno o da entrambi i testicoli immediatamente dopo la soppressione incruenta sono esposte ad una soluzione ipotonica e fissate secondo protocolli stabiliti (ad esempio (2) (14) (15)). Le cellule vengono poi poste sui vetrini e colorate (16) (17). Tutti i vetrini sono codificati in modo che la loro identità non sia visibile all'analista.

Analisi

32. Si analizzano almeno 200 metafasi ben spaziate per ciascun animale (3) (11). Se la frequenza dei controlli negativi storici è < 1 %, per aumentare la potenza statistica si analizzano più di 200 cellule/animale (3). Si usano metodi di colorazione che consentano l'identificazione del centro mero.

33. Le aberrazioni di tipo cromatidico e cromosomico devono essere registrate separatamente e classificate in sottotipi (rotture, scambi). I gap sono registrati, ma non se ne tiene conto per determinare se una sostanza chimica induce incrementi significativi dell'incidenza di cellule che presentano aberrazioni cromosomiche. Le procedure in uso nel laboratorio devono garantire che l'analisi delle aberrazioni cromosomiche sia effettuata da analisti qualificati. Poiché le procedure di preparazione dei vetrini causano spesso la

▼M8

rottura di una parte delle cellule in metafase, con conseguente perdita di cromosomi, le cellule conteggiate devono quindi contenere un numero di centro meri non inferiore a $2n \pm 2$, dove n è il numero aploide di cromosomi per quella specie.

34. Sebbene lo scopo della prova sia rilevare le aberrazioni cromosomiche strutturali, è importante registrare le frequenze di cellule poliploidi e di cellule che presentano cromosomi demoltiplicatore se si osservano tali eventi (cfr. il paragrafo 44).

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

35. I dati relativi a ciascun animale vanno presentati sotto forma di tabella. Per ciascun animale si valuta il numero di cellule con aberrazioni cromosomiche strutturali e il numero di aberrazioni cromosomiche per cellula. Occorre elencare separatamente le aberrazioni cromosomiche e quelle microclimatiche e classificarle in sottotipi (rotture, scambi) con l'indicazione del numero e della frequenza per i gruppi sperimentali e di controllo. I gap sono registrati separatamente. La frequenza dei gap viene indicata nella relazione, ma non viene generalmente inclusa nell'analisi della frequenza totale delle aberrazioni cromosomiche strutturali. Le percentuali di poliploidi e di cellule con cromosomi demoltiplicatore sono segnalate se osservate.

36. Devono figurare i dati sulla tossicità e i segni clinici (paragrafo 30).

Criteri di accettabilità

37. L'accettabilità della prova si basa sui seguenti criteri:

— I controlli negativi concomitanti sono coerenti con le norme pubblicate per i dati relativi ai controlli negativi storici, generalmente previste fra > 0 % e $\leq 1{,}5$ % delle cellule che presentano aberrazioni cromosomiche e con i dati dei controlli storici del laboratorio se disponibili (cfr. i paragrafi 10 e 18).

— I controlli positivi concomitanti inducono risposte coerenti con le norme pubblicate per i dati relativi ai controlli storici positivi, o con le banche dati dei controlli storici positivi del laboratorio, se disponibili, ed evidenziano un incremento statisticamente significativo rispetto ai controlli negativi (cfr. i paragrafi 17, 18).

— È stato analizzato un numero adeguato di cellule e dosi (cfr. i paragrafi 28 e 32).

— I criteri di selezione della concentrazione massima sono conformi a quelli descritti ai paragrafi 25 e 26.

38. Se si osservano sia mitosi che meiosi, al fine di stabilire un eventuale effetto cito tossico si determina il rapporto fra le cellule degli spermatogoni in mitosi e le cellule che si trovano nella prima e seconda metafase meiotica per tutti gli animali trattati e per i controlli negativi, su un campione totale di 100 cellule in divisione per animale. Se si osservano solo mitosi, si determina l'indice mitotico in almeno 1 000 cellule per animale.

Analisi e interpretazione dei risultati

39. Almeno tre gruppi di trattamento trattati devono essere analizzati al fine di ottenere dati sufficienti per l'analisi della relazione dose-risposta.

▼M8

40. A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è ritenuta chiaramente positiva se:

— almeno una delle dosi sperimentali presenta un incremento statisticamente significativo rispetto al concomitante controllo negativo;

— l'aumento è correlato alla dose almeno in uno dei momenti del campionamento; e

— uno o più risultati si situano al di fuori della serie accettabile di dati relativi ai controlli negativi storici o della distribuzione dei dati relativi ai controlli negativi storici (ad esempio limite di controllo al 95 % in base alla distribuzione di Poisson), se disponibili.

La sostanza chimica in esame è quindi ritenuta in grado di indurre aberrazioni cromosomiche nelle cellule degli spermatogoni degli animali sperimentali. Raccomandazioni sui metodi statistici più adeguati sono disponibili anche in letteratura (11) (18). L'animale deve essere considerato come unità sperimentale nei metodi statistici utilizzati.

41. A condizione che siano stati rispettati tutti i criteri di accettabilità, una sostanza chimica in esame è considerata chiaramente negativa se:

— nessuna delle dosi sperimentali presenta un incremento statisticamente significativo rispetto al concomitante controllo negativo;

— non si registrano aumenti correlati alla dose in nessuna condizione sperimentale; e

— tutti i risultati si situano entro la serie accettabile di dati relativi ai controlli negativi storici o dei dati relativi ai controlli negativi storici del laboratorio (ad esempio limite di controllo al 95 % in base alla distribuzione di Poisson), se disponibili.

La sostanza chimica in esame è quindi ritenuta non in grado di indurre aberrazioni cromosomiche nelle cellule degli spermatogoni degli animali sperimentali. Raccomandazioni sui metodi statistici più adeguati sono disponibili anche in letteratura (11) (18). Un risultato negativo non esclude la possibilità che la sostanza chimica possa indurre aberrazioni cromosomiche in fasi successive dello sviluppo non studiate oppure mutazioni geniche.

42. Non è necessario verificare una risposta chiaramente positiva o chiaramente negativa.

43. Se la risposta non è chiaramente negativa né chiaramente positiva, e per stabilire la rilevanza biologica di un risultato (ad esempio un aumento debole o marginale), i dati sono sottoposti al giudizio di esperti e/o a indagini più approfondite, avvalendosi dei dati sperimentali esistenti, ad es. quelli che indicano che il risultato positivo si situa al di fuori della serie accettabile di dati relativi ai controlli negativi o dei dati relativi ai controlli negativi storici del laboratorio (19).

44. In rari casi, anche dopo ulteriori analisi, quando la serie di dati non consente di valutare i risultati come positivi o negativi, i risultati sono dichiarati equivoci.

45. Un aumento del numero di cellule poliploidi può significare che la sostanza chimica in esame è potenzialmente in grado di inibire processi mitotici e di indurre aberrazioni numeriche nei cromosomi (20). Un aumento del numero di cellule con cromosomi demoltiplicatore può indicare che la sostanza chimica in esame è potenzialmente in grado di inibire la progressione del ciclo cellulare (21) (22), che è un meccanismo diverso dall'inibizione dei processi mitotici per indurre cambiamenti numerici dei cromosomi (cfr. il paragrafo 2). Pertanto, l'incidenza delle cellule poliploidi e quella delle cellule con cromosomi demoltiplicatore devono essere registrate separatamente.

▼M8

Relazione sull'esecuzione della prova

46. I seguenti dati devono figurare nella relazione sull'esecuzione della prova.

Sintesi

Sostanza chimica in esame:

— origine, numero di lotto e data di scadenza, se disponibile;

— stabilità della sostanza chimica in esame, se nota.

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente, se note;

— misurazione del pH, dell'osmolalità e del precipitato nel terreno di coltura al quale è stata aggiunta la sostanza chimica in esame, se del caso.

Sostanza monocostituente:

— aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;

— identificazione chimica, come la denominazione IUPAC o CAS, il numero CAS, il codice SMILES o InChI, la formula strutturale, l'identità chimica o impurezze, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc.

Sostanza multicostituente, UVCB e miscele:

— caratterizzata nella massima misura possibile con l'identità chimica (cfr. sopra), con la presenza quantitativa e con le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti.

Preparazione della sostanza chimica in esame:

— motivazione della scelta del mezzo disperdente;

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente.

— preparazione dei preparati per somministrazione per via alimentare, con l'acqua da bere o per inalazione;

— determinazione analitica dei preparati (ad esempio, stabilità, omogeneità, concentrazioni nominali) se effettuata.

Animali utilizzati nella prova:

— specie/ceppi usati e giustificazione della scelta;

— numero ed età degli animali;

— origine, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.;

— metodo di identificazione univoca degli animali

— per gli studi a breve termine: peso di ciascun animale all'inizio e alla fine della prova; per gli studi di durata superiore a una settimana: peso di ciascun individuo durante lo studio e consumo di cibo. Devono essere inclusi l'intervallo, la media e la deviazione standard per ciascun gruppo.

Condizioni sperimentali:

— dati sui controlli positivi e negativi (mezzo disperdente/solvente);

▼M8

— dati della prova per determinare l'intervallo delle dosi, se effettuato;

— criteri di selezione delle dosi;

— criteri di selezione della via di somministrazione;

— dettagli della preparazione della sostanza in esame;

— modalità precise di somministrazione della sostanza chimica in esame;

— criteri di determinazione del momento della soppressione incruenta;

— metodi di misurazione della tossicità animale, compresi, se disponibili, analisi istopatologiche o ematologiche e la frequenza con cui è stato misurato il peso corporeo e sono state realizzate osservazioni sugli animali;

— metodi atti a verificare che la sostanza in esame ha raggiunto il tessuto bersaglio o la circolazione sanguigna, se i risultati sono negativi;

— dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno) calcolata in funzione della concentrazione (ppm) della sostanza chimica in esame contenuta nella dieta/acqua da bere e del consumo, se del caso;

— dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua;

— descrizione dettagliata dello schema di trattamento e di campionamento e giustificazione delle scelte;

— metodo di soppressione incruenta degli animali;

— metodo di analgesia (se usato)

— procedure per isolare i tessuti;

— natura e concentrazione dell'inibitore della metafase, durata di esposizione del trattamento;

— metodi di preparazione dei vetrini;

— criteri di conteggio delle aberrazioni;

— numero di cellule analizzate per animale;

— criteri in base ai quali i risultati sono considerati positivi, negativi o ambigui.

Risultati:

— condizioni dell'animale prima e durante il periodo di saggio, compresi i segni di tossicità;

— peso corporeo e degli organi al momento della soppressione incruenta (in caso di trattamenti multipli, pesi corporei registrati durante il regime di trattamento);

— segni di tossicità;

— indice mitotico;

— rapporto fra le cellule degli spermatogoni in mitosi e le cellule che si trovano nella prima e seconda metafase meiotica, o altra risposta dell'esposizione al tessuto bersaglio;

— tipo e numero di aberrazioni, indicati separatamente per ciascun animale;

— numero totale delle aberrazioni per gruppo, con medie e deviazioni standard;

▼**M8**

— numero di cellule che presentano aberrazioni per gruppo, con medie e deviazioni standard;

— relazione dose-risposta, ove possibile;

— analisi e metodi statistici applicati;

— dati sui controlli negativi concomitanti;

— dati sui controlli negativi storici, con intervalli, medie e deviazioni standard nonché intervallo di confidenza del 95 % (se disponibile) o dati pubblicati sui controlli negativi storici usati per l'accettabilità dei risultati della prova;

— dati sui controlli positivi concomitanti;

— eventuali cambiamenti di aploidia, comprese le frequenze di poliploidi e/o delle cellule demoltiplicatore;

Discussione dei risultati

Conclusione

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris

(2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

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

(4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.

(5) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379.Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

(7) Cattanach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.

(8) Cattanach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.

(9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.

▼M8

(10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313–324.

(11) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19–30.

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

(13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

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

(15) Hsu, T.C., Elder, F. and Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. Environ. Mutagen., 1, 291-294.

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

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

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

(19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. Mutation Res., 723, 87-90.

(20) Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, Mutation Res., 287, 29-46.

(21) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. Cancer Res., 43, 1362-1364.

(22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. Mutation Res., 119, 403-413.

▼M8

Appendice

DEFINIZIONI

Aneuploidia: qualsiasi deviazione dal normale numero diploide (o aploide) di cromosomi da parte di uno o più cromosomi, ma non dell'intero corredo di cromosomi (poliploidi).

Centromero: regione/i di un cromosoma cui si attaccano le del fuso durante la divisione cellulare, permettendo il corretto movimento dei cromosomi figli verso i poli delle cellule figlie.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Diversità dei cromosomi: diversità delle forme (ad esempio metacentrici, acro centrici, ecc.) e delle dimensioni dei cromosomi.

Aberrazione di tipo cromatidico: alterazione cromosomica strutturale che si manifesta nella rottura di un singolo cromati dio o nella rottura e ricongiunzione di cromatisi.

Aberrazione di tipo cromosomico: alterazione cromosomica strutturale che si manifesta nella rottura, o nella rottura e ricongiunzione, di entrambi i cromatisi in uno stesso punto.

Clastogeno: qualsiasi sostanza chimica che causa aberrazioni cromosomiche strutturali in popolazioni di cellule o organismi.

Gap: lesione acromatica di ampiezza inferiore a un cromatine, con minimo disallinea mento dei cromatisi.

Genotossico: termine generico che comprende tutti i tipi di danno a carico del DNA o dei cromosomi, tra cui rotture, cancellazioni, addotti, alterazioni e collegamenti nucleotidi, ridispacciamento, mutazioni, aberrazioni cromosomiche e annexi_and_ia. Non tutti i tipi di effetti genotossici determinano alterazioni cromosomiche o danni permanenti ai cromosomi.

Indice mitotico (MI): rapporto tra le cellule in metafase diviso per il numero totale di cellule osservate in una popolazione cellulare: costituisce un'indicazione del grado di proliferazione della popolazione cellulare.

Mitosi: divisione del nucleo cellulare, solitamente suddivisa in profase, pro metafase, metafase, analysis e telofase.

Mutageno: un fattore in grado di provocare mutazioni ereditarie della o delle sequenze di coppie di basi del DNA nei geni o della struttura dei cromosomi (aberrazioni cromosomiche).

Aberrazione numerica: variazione del numero di cromosomi rispetto al numero diploide caratteristico della specie.

Poliploidi: un multiplo del numero di cromosomi aploidi (n) diverso dal numero diploide (ossia $3n$, $4n$ ecc.).

Aberrazione strutturale: alterazione della struttura cromosomica visibile all'esame microscopico dello stadio di metafase della divisione cellulare, che si presenta con dilezione e alterazioni di segmenti, scambi.

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

UVCB: sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici.

▼M7

_____

▼B

B.25. TRASLOCAZIONI EREDITABILI: TOPO

▼M9

Questo metodo di prova è stato soppresso in quanto non è più riconosciuto come idoneo per acquisire informazioni sulle proprietà tossicologiche delle sostanze chimiche ai fini del regolamento (CE) n. 1907/2006. I metodi di prova applicabili per l'endpoint in questione figurano nella tabella 2 della parte 0.

▼B

B.26. **TEST DI TOSSICITÀ ORALE SUBCRONICA — STUDIO DELLA TOSSICITÀ ORALE CON SOMMINISTRAZIONE RIPETUTA DI DOSI PER 90 GIORNI SUI RODITORI**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼B

B.27. **TEST DI TOSSICITÀ ORALE SUBCRONICA — STUDIO DELLA TOSSICITÀ ORALE CON SOMMINISTRAZIONE RIPETUTA DI DOSI PER 90 GIORNI SUI NON RODITORI**

1. **METODO**

Questo metodo di tossicità orale subcronica corrisponde al TG 409 (1998) dell'OCSE.

1.1. INTRODUZIONE

Nella valutazione e nel giudizio delle caratteristiche tossiche di una sostanza chimica è possibile determinare la tossicità orale subcronica con dosi ripetute dopo aver ottenuto dati preliminari sulla tossicità mediante test di tossicità acuta o con dosi ripetute per 28 giorni. Lo studio di 90 giorni fornisce informazioni sui possibili rischi per la salute che potrebbero derivare dall'esposizione ripetuta in un periodo di rapida crescita, fino alla giovane età adulta. Con questo studio si otterranno dati sui principali effetti tossici, sugli organi bersaglio e sulla possibilità di accumulo, mediante i quali si potrà stimare il livello di esposizione al quale non si osservano effetti avversi che può essere utilizzato per scegliere i livelli delle dosi per gli studi cronici e per definire i criteri di sicurezza relativi all'esposizione di soggetti umani.

Il metodo di test consente di identificare gli effetti avversi dell'esposizione a sostanze chimiche in specie di non roditori e va usato solo:

— nei casi in cui gli effetti osservati in altri studi indichino la necessità di procedere ad un chiarimento o ad una caratterizzazione in un secondo test su specie di non roditori, oppure

— nei casi in cui gli studi tossicocinetici indichino che sia meglio utilizzare una particolare specie di non roditori, oppure

— nei casi in cui altri motivi specifici giustifichino l'uso di una specie di non roditori.

Cfr. anche introduzione generale, parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Dose: quantità della sostanza di prova somministrata. La dose si esprime in termini di peso (g, mg) o di peso della sostanza in esame per unità di peso dell'animale sperimentale (ad esempio mg/kg), oppure in termini di concentrazioni dietetiche costanti (ppm).

Dosaggio: termine generico che comprende la dose, la frequenza e la durata della somministrazione.

NOAEL: abbreviazione di «no observed adverse effect level» (livello al quale non si osservano effetti dannosi): il più alto livello di dose a cui non si osservano effetti avversi correlati al trattamento.

1.3. PRINCIPIO DEL METODO UTILIZZATO

Ogni giorno, per un periodo di 90 giorni, si somministra per via orale la sostanza in esame in dosi crescenti a vari gruppi di animali da esperimento, laddove ad ogni gruppo corrisponde un determinato livello di dose. Durante il periodo di somministrazione si tengono gli animali sotto attenta osservazione per individuare eventuali segni di tossicità. Gli animali che muoiono o vengono sacrificati durante il test sono sottoposti a esame necroscopico e, a conclusione del test, anche gli animali sopravvissuti vengono sacrificati e sottoposti a esame necroscopico.

▼B

1.4. DESCRIZIONE DEL METODO UTILIZZATO

1.4.1. **Selezione delle specie di animali**

La specie di non roditori comunemente utilizzata è il cane, preferibilmente di razza definita: spesso si utilizza la razza beagle, è possibile utilizzare anche altre specie, come il maiale, il mini-pig ed altri. Si raccomanda di non utilizzare primati, la cui scelta va motivata. Si utilizzano animali giovani e sani e, nel caso del cane, la somministrazione deve iniziare preferibilmente a 4-6 mesi e comunque entro il 9° mese di vita. Per gli studi preliminari a studi della tossicità cronica a lungo termine, è necessario usare la stessa specie o la stessa razza in entrambi gli studi.

1.4.2. **Preparazione degli animali**

Si utilizzano solo animali sani e giovani che siano stati acclimatati alle condizioni di laboratorio e non siano stati sottoposti a precedenti procedure sperimentali. La durata dell'acclimatazione dipende dalla specie selezionata per il test e dalla sua origine. Si raccomanda un periodo di almeno 5 giorni per cani o maiali di una colonia residente allevati a scopo sperimentale, e di almeno 2 settimane per gli stessi animali provenienti da fonti esterne. Gli animali sperimentali vanno caratterizzati per specie, ceppo, origine, sesso, peso e/o età. L'assegnazione degli animali al gruppo di controllo e di trattamento avviene mediante randomizzazione. Le gabbie vanno disposte in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. A ogni animale deve essere assegnato un numero di identificazione esclusivo.

1.4.3. **Preparazione delle dosi**

La sostanza in esame può essere somministrata nella dieta o nell'acqua di abbeveraggio, mediante sonda gastrica o in capsule. Il metodo di somministrazione orale dipende dallo scopo dello studio e dalle caratteristiche fisico-chimiche del materiale in esame.

Se necessario, la sostanza di prova viene disciolta o posta in sospensione in un veicolo adeguato. Dove possibile, si raccomanda di prendere anzitutto in considerazione la possibilità di utilizzare una soluzione/sospensione acquosa, indi una soluzione/emulsione in olio (ad esempio olio di mais) e infine una soluzione in altri veicoli. Se si usano veicoli diversi dall'acqua è necessario conoscerne le caratteristiche tossiche. Occorre determinare inoltre la stabilità della sostanza di prova nelle condizioni di somministrazione.

1.5. PROCEDURA

1.5.1. **Numero e sesso degli animali**

Per ciascun livello di dose vanno usati almeno otto animali (quattro femmine e quattro maschi). Qualora si preveda di sacrificare a intervalli intermedi alcuni animali, il numero va aumentato del numero di animali che si prevede di sacrificare prima del completamento dello studio. Il numero di animali al termine dello studio deve essere tale da consentire di effettuare una valutazione significativa degli effetti tossici. In base alle precedenti conoscenze sulla sostanza chimica o su una sostanza analoga, occorre valutare la possibilità di includere un ulteriore gruppo satellite di otto animali (quattro per sesso) nel gruppo di controllo e in quello trattato col livello di dose più elevato, allo scopo di osservare, dopo il periodo di trattamento, la reversibilità o la persistenza di eventuali effetti tossici. La durata di tale periodo post-trattamento va stabilita adeguatamente tenendo conto degli effetti osservati.

▼B

1.5.2. **Dosaggio**

Occorre utilizzare almeno tre livelli di dose e un controllo concomitante, tranne quando si esegue un test limite (cfr. 1.5.3). I livelli di dose possono essere basati sui risultati di precedenti studi con dosi ripetute o di definizione del rango e devono tenere conto dei dati tossicologici e tossicocinetici esistenti disponibili relativi al composto in esame o a materiali analoghi. A meno che non sia limitato dalla natura fisico-chimica o dagli effetti biologici della sostanza in esame, il livello di dose più elevato va scelto con l'obiettivo di indurre tossicità, senza provocare il decesso o arrecare gravi sofferenze. Occorre scegliere una sequenza decrescente dei livelli di dose per poter eventualmente dimostrare la correlazione dosaggio/risposta e un NOAEL al livello di dose più basso. In genere, per definire i livelli decrescenti di dose è ottimale l'impiego di intervalli multipli di un numero compreso fra due e quattro e, spesso, l'aggiunta di un quarto gruppo sperimentale è preferibile all'uso di intervalli molto ampi (ad esempio, più di un fattore di circa 6-10) fra i dosaggi.

Il gruppo di controllo deve essere non trattato oppure, se per somministrare la sostanza di prova si impiega un veicolo, trattato solo con il veicolo. Salvo il trattamento con la sostanza in esame, gli animali del gruppo di controllo vanno manipolati esattamente come quelli dei gruppi sperimentali. Se si utilizza un veicolo, il gruppo di controllo deve riceverne il volume più elevato somministrato. Se la sostanza di prova viene somministrata con la dieta e concorre a ridurre l'assunzione di cibo da parte degli animali, per distinguere fra la riduzione dovuta a questo fatto e quella determinata dalle alterazioni tossicologiche può essere utile un gruppo di controllo pair-fed.

Occorre tenere conto delle seguenti caratteristiche del veicolo e di eventuali altri additivi: effetti su assorbimento, distribuzione, metabolismo o ritenzione della sostanza di prova; effetti sulle proprietà chimiche della sostanza di prova che potrebbero alterarne le caratteristiche tossiche; effetti sul consumo di cibo o di acqua o sulle condizioni nutrizionali degli animali.

1.5.3. **Test limite**

Se, impiegando la procedura descritta per il presente studio, un test a un livello di dose equivalente ad almeno 1 000 mg/kg di peso corporeo/die non produce effetti avversi e se, sulla base dei dati relativi a sostanze strutturalmente affini, non si prevede tossicità, ci si può esimere dal condurre uno studio completo con tre livelli di dose. Il test limite non si applica quando l'esposizione di soggetti umani indica la necessità di utilizzare un livello di dose più elevato.

1.3.4. **Somministrazione delle dosi**

Le dosi della sostanza in esame devono essere amministrate quotidianamente, sette giorni alla settimana, per 90 giorni. Occorre giustificare la scelta di eventuali altri regimi di dosaggio (ad esempio cinque giorni alla settimana). Se si utilizza una sonda gastrica o una cannula per intubazione, la somministrazione deve avvenire in dose unica. Il volume massimo di liquido somministrabile ogni volta dipende dalle dimensioni dell'animale sperimentale e di norma va mantenuto al minimo possibile. Ad eccezione delle sostanze irritanti o corrosive, che in genere producono effetti più forti a concentrazioni più elevate, occorre ridurre al minimo la variabilità del volume da somministrare regolando la concentrazione in modo da mantenere il volume costante a tutti i livelli di dose.

▼B

Per le sostanze somministrate con la dieta o l'acqua di abbeveraggio è importante impedire che le quantità della sostanza in esame interferiscano con la normale alimentazione o il normale bilancio dei liquidi. Quando la sostanza in esame viene somministrata nella dieta si possono usare sia una concentrazione dietetica costante (ppm), sia un livello di dose costante in termini di peso corporeo dell'animale ed occorre motivare l'opzione scelta. Se si utilizza invece l'alimentazione forzata mediante sonda gastrica o se si somministrano capsule, la dose va somministrata ogni giorno più o meno alla stessa ora, regolandola adeguatamente per mantenere la dose a un livello costante rispetto al peso corporeo dell'animale. Se lo studio sul periodo di 90 giorni è preliminare ad uno studio sulla tossicità cronica a lungo termine, occorre utilizzare una dieta simile in entrambi.

1.5.5. **Osservazioni**

Il periodo di osservazione deve essere di almeno 90 giorni. Gli animali del gruppo satellite destinato a osservazioni di follow-up non vanno trattati per un periodo adeguato, allo scopo di individuare la persistenza o la remissione degli effetti tossici.

Le osservazioni cliniche vanno effettuate almeno una volta al giorno, preferibilmente alla/e stessa/e ora/e, tenendo conto del periodo di picco degli effetti previsti dopo la somministrazione. Occorre registrare le condizioni cliniche degli animali. Per identificare segni di morbilità e mortalità tutti gli animali vanno osservati almeno due volte al giorno, in genere all'inizio e alla fine della giornata.

Tutti gli animali vanno sottoposti a dettagliate osservazioni cliniche almeno una volta prima della prima esposizione (per consentire il confronto all'interno dei gruppi di soggetti) e, successivamente, una volta alla settimana. Le osservazioni vanno eseguite, se fattibile, fuori dalla gabbia di stabulazione, preferibilmente in un ambiente standard e sempre all'inarca allo stesso orario. Occorre adottare ogni misura per ridurre al minimo le variazioni delle condizioni di osservazione. I segni di tossicità, compresi il momento dell'esordio, il grado e la durata, vanno accuratamente registrati. I segni da osservare sono almeno i seguenti: cambiamenti a livello cutaneo, del pelo, degli occhi e delle mucose, presenza di secrezioni ed escrezioni e attività neurovegetativa (ad esempio lacrimazione, piloerezione, reazioni pupillari, alterazioni della respirazione). Vanno inoltre registrati cambiamenti dell'andatura, della postura e della risposta alla manipolazione, nonché la presenza di movimenti tonici o clonici, stereotipie (ad esempio tendenza a pulirsi eccessivamente, a girare in cerchio) e qualsiasi comportamento insolito.

Prima della somministrazione della sostanza in esame e a conclusione dello studio occorre eseguire un esame oftalmologico, mediante un oftalmoscopio o analogo dispositivo idoneo, preferibilmente su tutti gli animali o comunque almeno sul gruppo a cui viene somministrata la dose più elevata e sui controlli. Se si riscontrano alterazioni degli occhi correlate al trattamento è necessario esaminare tutti gli animali.

1.5.5.1. *Peso corporeo e assunzione di cibo/acqua*

Tutti gli animali vanno pesati almeno una volta alla settimana. La misurazione del consumo di cibo va eseguita almeno con cadenza settimanale. Se la sostanza in esame viene somministrata con l'acqua di abbeveraggio, anche il consumo di acqua va misurato almeno con cadenza settimanale. È utile tener conto del consumo di acqua anche negli studi con somministrazione mediante dieta o sonda gastrica perché potrebbe risultare alterato.

▼B

1.5.5.2. *Ematologia e biochimica clinica*

Occorre prelevare campioni di sangue da un sito specifico e conservarli, se opportuno, in condizioni adeguate. Alla fine del test si raccolgono campioni di sangue subito prima o nel corso della procedura di soppressione degli animali.

Gli esami ematologici, compresi ematocrito, concentrazione di emoglobina, conta degli eritrociti, conta totale e differenziale dei leucociti, conta delle piastrine e una misurazione del potenziale di coagulazione scelta tra tempo dì coagulazione, tempo di protrombina o tempo di tromboplastina, vanno eseguiti all'inizio dello studio e successivamente a intervalli mensili o a metà del periodo di test e infine alla conclusione del test.

Le determinazioni biochimiche cliniche per lo studio degli effetti tossici gravi sui tessuti e, specificamente, gli effetti su reni e fegato, vanno condotte su campioni di sangue prelevati da tutti gli animali all'inizio dello studio, poi a intervalli mensili o a metà del test, e infine a conclusione del periodo di test. Gli elementi da valutare sono l'equilibrio elettrolitico, il metabolismo dei carboidrati e la funzionalità epatica e renale. La scelta di test specifici sarà influenzata dalle osservazioni sulla modalità di azione della sostanza di prova. Prima della raccolta dei campioni di sangue, gli animali vanno lasciati a digiuno per un periodo adeguato alla specie. Si consiglia di determinare calcio, fosforo, cloruro, sodio, potassio, glucosio a digiuno, alanina aminotransferasi, aspartato aminotransferasi, ornitindecarbossilasi, gamma-glutamil-transpeptidasi, azoto ureico, albumina, creatininemia, bilirubina totale e proteine sieriche totali.

L'analisi delle urine va effettuata almeno all'inizio dello studio e successivamente a metà e alla conclusione, raccogliendo le urine in tempi prestabiliti. Le determinazioni da effettuare comprendono aspetto, volume, osmolalità o densità relativa, pH, proteine, glucosio e sangue/cellule ematiche. Se necessario, per ampliare lo studio dell'effetto o degli effetti osservato/i è possibile impiegare ulteriori parametri.

È inoltre necessario considerare la possibilità di condurre studi sui marker dei danni generici ai tessuti. Altre determinazioni che possono rendersi necessario per un'adeguata valutazione tossicologica comprendono le analisi dei lipidi, degli ormoni, equilibrio acidi/basi, metaemoglobina e inibizione della colinesterasi. Se necessario, per ampliare lo studio degli effetti osservati è possibile effettuare ulteriori esami biochimici clinici. Queste determinazioni vanno effettuate per alcune classi di sostanze chimiche oppure caso per caso.

Nel complesso è necessario adottare un approccio flessibile, in funzione delle specie e dell'effetto osservato e/o previsto relativo ad una data sostanza.

1.5.5.3. *Necroscopia macroscopica*

Tutti gli animali dello studio vanno sottoposti a completa e dettagliata necroscopia macroscopica che comprende un attento esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi e delle cavità cranica, toracica e addominale e del loro contenuto. Fegato (compresa la cistifellea), reni, ghiandole surrenali, testicoli, epididimi, ovaie, utero, tiroide (con paratiroidi), timo, milza, cervello e cuore di tutti gli animali (tranne quelli trovati moribondi e/o sacrificati nel frattempo) vanno opportunamente liberati da eventuali tessuti aderenti e pesati umidi immediatamente dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento.

▼B

I seguenti tessuti vanno conservati nel mezzo di fissazione più adatto, sia per il tipo di tessuto, sia per il successivo esame istopatologico che si intende effettuare: tutte le lesioni macroscopiche, cervello (porzioni rappresentative comprendenti cervello, cervelletto, bulbo e/o ponte), midollo spinale (a tre livelli: cervicale, mediotoracico e lombare), ghiandola pituitaria, occhi, tiroide, paratiroide, timo, esofago, ghiandole salivari, stomaco, intestino tenue e crasso (comprese le placche di Peyer), fegato, cistifellea, pancreas, reni, ghiandole surrenali, milza, cuore, trachea e polmoni, aorta, gonadi, utero, annessi, ghiandola mammaria delle femmine, prostata, vescica, linfonodi (preferibilmente un linfonodo interessato dalla via di somministrazione e un altro distante dalla via di somministrazione per coprire gli effetti sistemici), un nervo periferico (sciatico o tibiale) preferibilmente in prossimità del muscolo, una sezione di midollo osseo (e/o un aspirato di midollo osseo fresco) e cute. I reperti clinici e di altro tipo possono evidenziare la necessità di esaminare altri tessuti. Vanno inoltre conservati tutti gli organi considerati organi bersaglio in base alle proprietà note della sostanza in esame.

1.5.5.4. *Esame istopatologico*

Vanno sottoposti a esame istopatologico completo gli organi e i tessuti conservati di almeno tutti gli animali del gruppo di controllo e del gruppo che riceve la dose più elevata. Si procede a questo esame anche sugli animali degli altri gruppi qualora nel gruppo a cui viene somministrata la dose più elevata si osservano alterazioni correlate al trattamento.

Vanno esaminate tutte le lesioni macroscopiche.

Quando si utilizza un gruppo satellite l'esame istopatologico va eseguito sui tessuti e sugli organi per i quali sono stati osservati effetti nei gruppi trattati.

2. **DATI E RELAZIONE**

2.1. DATI

I dati devono essere forniti separatamente per ogni soggetto. Inoltre, tutti i dati vanno riassunti sotto forma di tabelle che indichino per ogni gruppo sperimentale il numero di animali presenti all'inizio della prova, il numero di animali trovati morti durante il test o sacrificati per motivi umanitari e il momento di tutti i decessi/soppressioni, il numero di animali che presentano segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati, quali momento dell'esordio, durata e gravità di tutti gli effetti tossici, il numero di animali che presentano lesioni, il tipo di lesioni e la percentuale di animali rapportata al tipo di lesione.

I risultati numerici vanno valutati mediante un metodo statistico adeguato e generalmente accettabile. I metodi statistici e i dati da analizzare vanno scelti già in sede di determinazione del disegno sperimentale.

2.2. RELAZIONE SUL TEST

La relazione sul test deve contenere le seguenti informazioni:

▼B

2.2.1. **Sostanza di prova:**

— natura fisica, purezza e proprietà fisico-chimiche,

— dati identificativi,

— veicolo (se utilizzato): motivazione per la scelta del veicolo, se diverso dall'acqua.

2.2.2. **Specie di prova:**

— specie e ceppo usati,

— numero, età e sesso degli animali,

— origine, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.,

— peso dei singoli animali all'inizio del test.

2.2.3. **Condizioni di esecuzione del test:**

— motivo della scelta del livello di dose,

— dettagli sulla formulazione della sostanza in esame/preparazione dietetica, sulla concentrazione ottenuta, sulla stabilità e l'omogeneità della preparazione,

— dettagli sulla somministrazione della sostanza in esame,

— dosi effettive (mg/kg di peso corporeo/die) e fattore di conversione dalla concentrazione della sostanza di prova nella dieta/acqua di abbeveraggio (ppm) alla dose effettiva, se del caso,

— particolari sulla qualità del cibo e dell'acqua.

2.2.4. **Risultati:**

— peso corporeo/cambiamenti del peso corporeo,

— assunzione di cibo, ed eventualmente di acqua,

— dati sulla risposta tossica per sesso e livello di dose, compresi segni di tossicità,

— natura, gravità e durata delle osservazioni cliniche (reversibili o meno),

— esame oftalmologico,

— test ematologici con i relativi valori basali,

— test biochimici cimici con i relativi valori basali,

— peso corporeo terminale, peso degli organi e rapporti tra peso degli organi e peso corporeo,

— risultati della necroscopia,

— descrizione dettagliata di tutti i reperti istopatologici,

— dati sull'assorbimento, se disponibili,

— elaborazione statistica dei risultati, se del caso.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

▼B

B.28 **SAGGIO DI TOSSICITÀ CUTANEA SUBCRONICA SAGGIO CON SOMMINISTRAZIONE CUTANEA RIPETUTA DI DOSI PER 90 GIORNI USANDO SPECIE DI RODITORI**

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Vedi introduzione generale, parte B.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4. PRINCIPI DEL METODO DI SAGGIO

La sostanza sperimentale viene applicata quotidianamente alle cute in dosi scalari a vari gruppi di animali da esperimento, una dose per gruppo per un periodo di 90 giorni. Durante il periodo di somministrazione, gli animali vengono giornalmente sottoposti ad osservazione per individuare segni di tossicità. Gli animali che muoiono durante il saggio vengono sottoposti a necroscopia, ed alla conclusione della prova anche gli animali superstiti vengono sottoposti a necroscopia.

1.5. CRITERI QUALITATIVI

Nessuno.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

Preparazioni

Gli animali sono tenuti nelle condizioni sperimentali di alloggiamento ed alimentazione per almeno 5 giorni prima dell'inizio del saggio. Prima dell'esperimento, gli animali giovani e sani vengono mischiati con metodo casuale ed assegnati ai gruppi di trattamento e di controllo. Poco prima dell'inizio dell'esperimento gli animali da trattare vengono tosati nella zona dorsale del tronco. Si può usare la rasatura, ma questa dovrebbe essere effettuata circa 24 ore prima del saggio. La tosatura o la rasatura usualmente deve essere ripetuta ad intervalli approssimativamente settimanali. Durante la tosatura o la rasatura del pelo, occorre fare attenzione a non scorticare la pelle. La superficie corporea da trattare per l'applicazione della sostanza in esame non dovrebbe essere inferiore al 10 % del totale. Il peso dell'animale dovrebbe essere preso in considerazione quando si decidono le dimensioni delle superficie da liberare dal pelo e dalla copertura. Quando si saggiano solidi, che possono essere polverizzati se del caso, la sostanza in esame dovrebbe essere umidificata sufficientemente con l'acqua o, se necessario, con un veicolo adatto per assicurare un buon contatto con la pelle. Le sostanze in esame liquide sono in genere usate non diluite. L'applicazione quotidiana si estenderà da 5 a 7 giorni per settimana.

Condizioni sperimentali

Animali da esperimento

Si possono utilizzare esemplari adulti di ratto, coniglio o cavia. Altre specie possono essere utilizzate, ma il loro uso richiede una giustificazione. All'inizio del saggio, la gamma di variazione del peso dovrebbe essere ± 20 % del peso medio. Quando uno studio di tossicità subcronica cutanea viene condotto come preliminare ad uno studio a lungo termine, in entrambi gli studi si dovrebbe usare la stessa specie e lo stesso ceppo.

▼B

Numero e sesso

Per ciascun livello di dose si dovrebbero utilizzare almeno 20 animali (10 maschi e 10 femmine) con pelle sana. Le femmine dovrebbero essere nullipare e non gravide. Se si prevede di sacrificare ad intervalli alcuni animali, il numero totale dovrebbe essere aumentato del numero di animali che si prevede di sacrificare prima del completamento dello studio. Inoltre, un gruppo satellite di 20 animali (10 animali per sesso) può essere trattato con il livello di dose elevato per 90 giorni e sottoposto ad osservazione per l'individuazione della reversibilità, della persistenza o dell'insorgenza ritardata di effetti tossici per 28 giorni dopo il trattamento.

Livelli di dose

Almeno tre livelli di dose con un controllo o un controllo del veicolo, se si utilizza un veicolo, sono richiesti. Il periodo di esposizione dovrebbe essere di almeno 6 ore al giorno. L'applicazione della sostanza in esame dovrebbe essere eseguita ogni giorno alla stessa ora e la quantità di sostanza applicata dovrebbe essere aggiustata a intervalli (settimanali o bisettimanali) per mantenere un livello costante di dose in termini di peso corporeo dell'animale. Eccezion fatta per il trattamento con la sostanza in esame, gli animali nel gruppo di controllo dovrebbero essere trattati in modo identico ai soggetti dei gruppi trattati. Quando per facilitare il dosaggio si usa un veicolo, il gruppo di controllo del veicolo dovrebbe essere sottoposto a dosaggio come i gruppi trattati, e ricevere la stessa quantità che riceve il gruppo a livello di dose più elevata. Il livello di dose più elevato dovrebbe provocare effetti tossici ma produrre pochi o nessun decesso. Il livello di dose più basso non dovrebbe produrre effetti tossici. Quando esista una valutazione utile di esposizione umana, il livello più basso dovrebbe superare questo valore. Idealmente, il livello di dose intermedio dovrebbe produrre effetti tossici osservabili minimi. Se viene usata più di una dose intermedia, i livelli di dose dovrebbero essere intervallati per produrre una graduazione degli effetti tossici. Nei gruppi trattati con livello di dose basso, intermedio e nei controlli, l'incidenza delle morti dovrà essere bassa e tale da permettere una valutazione significativa dei risultati.

Se l'applicazione della sostanza in esame produce irritazioni gravi della pelle, le concentrazioni dovrebbero essere ridotte e ciò può provocare una riduzione, o l'assenza, di altri effetti tossici al livello di dose elevato. Sela pelle è stata gravemente danneggiata, può rendersi necessaria l'interruzione dello studio, Si procederà quindi a un nuovo studio con concentrazione più basse.

Saggio limite

Se uno studio preliminare con livello di dose di 1 000 mg/kg o un livello di dose più elevato in relazione a una possibile esposizione umana, quando questa sia nota, non produce effetti tossici, ulteriori prove possono non essere considerate necessarie.

Periodo di osservazione

Gli animali da esperimento dovrebbero essere osservati quotidianamente per individuare eventuali segni di tossicità. Il tempo della morte e quello dell'insorgenza o della scomparsa dei segni di tossicità dovrebbero essere registrati.

▼B

Procedimento

Gli animali dovrebbero essere ingabbiati individualmente e sottoposti a trattamento con la sostanza in esame, idealmente 7 giorni per settimana, per un periodo di 90 giorni.

Gli animali appartenenti a ciascun gruppo satellite previsto per ulteriori osservazioni dovrebbero essere mantenuti ancora per 28 giorni per individuare i sintomi di guarigione oppure di persistenza degli effetti tossici. Il tempo di esposizione dovrebbe essere 6 ore/giorno.

La sostanza in esame dovrebbe essere applicata uniformemente su un'area che è approssimativamente il 10 % della superficie corporea totale. Con sostanze molto tossiche, la superficie coperta può essere inferiore, ma deve comunque essere coperta da uno strato più uniforme e più sottile possibile.

Durante l'esposizione, la sostanza in esame viene tenuta a contatto con la pelle da una fascia porosa di garza e da un nastro non irritante. La superficie cutanea su cui è applicata la sostanza dovrebbe essere coperta opportunamente in modo da trattenere la fascia e la sostanza in esame, per evitare un'eventuale ingestione da parte degli animali della sostanza in esame. Si può ricorrere a mezzi per limitare i movimenti dell'animale, ma l'immobilizzazione completa non è un metodo raccomandato.

Alla fine del periodo di esposizione, la sostanza in esame residua dovrebbe essere rimossa, ove possibile, con l'uso di acqua o con qualche altro metodo appropriato per pulire la pelle.

Tutti gli animali dovrebbero essere quotidianamente sottoposti a osservazione e si dovrebbe registrare i segni di tossicità, incluso il tempo d'insorgenza, l'intensità e la durata. Le osservazioni collaterali dovrebbero includere i cambiamenti della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose, nonché del sistema nervoso centrale e autonomo, del sistema respiratorio e circolatorio, dell'attività somatomotoria e del quadro comportamentale. Si dovrebbe procedere settimanalmente alla misura del consumo alimentare e alla pesatura degli animali. L'osservazione regolare degli animali è necessaria per assicurarsi che gli stessi non siano persi a causa di cannibalismo, autolisi dei tessuti o smarrimento. Alla fine del periodo di studio tutti gli animali sopravvissuti dei gruppi di trattamento non satelliti sono sottoposti a necroscopia. Gli animali moribondi dovrebbero essere rimossi e sottoposti a necroscopia.

I seguenti esami vengono effettuati abitualmente per tutti gli animali, compresi i controlli:

a) l'esame oftalmoscopico, eseguito con un oftalmoscopio o attrezzatura analoga, dovrebbe essere effettuato prima della somministrazione della sostanza sperimentale e alla conclusione dello studio, preferibilmente su tutti gli animali, o perlomeno su quelli a cui vengono somministrati il dosaggio elevato, e infine al gruppo di controllo. Se vengono individuati cambiamenti negli occhi, tutti gli animali dovrebbero essere esaminati;

b) alla fine del periodo di saggio, si dovrebbero effettuare le seguenti analisi: ematologia, incluso ematocrito, concentrazione di emoglobina degli eritrociti, conteggio totale e differenziale dei leucociti, misurazione del potenziale di coagulazione, quale il tempo di coagulazione, il tempo di protrombina, il tempo di tromboplastina o il conteggio delle piastrine;

▼B

c) la determinazione della biochimica clinica sul sangue dovrebbe essere effettuata alla fine del periodo di saggio. Le aree di studio, ritenute opportune per tutti gli studi sono: equilibrio degli elettroliti, metabolismo dei carboidrati, funzione epatica e renale. La selezione di prove specifiche sarà determinata dalle osservazioni sul modo di azione della sostanza. Si suggerisce di determinare: calcio, fosforo, cloruro, sodio, potassio, glucosio a digiuno (con periodo di digiuno appropriato alla specie), glutamminico-piruvica transaminasi serica ([1]), glutammico-ossalacetico transaminasi serica ([2]), ornitina decarbossilasi, gamma glutammil transpeptidase, azoto ureico, albumina, creatinina ematica, bilirubina totale e proteine totali del siero. Altre determinazioni che possono rendersi necessarie per una valutazione tossicologica adeguata, includono: analisi dei lipidi, ormoni, equilibrio acido/base, metaemoglobina, attività della colinesterasi. Determinazioni biochimiche supplementari possono essere usate, se necessarie, per estendere la ricerca di effetti osservati;

d) l'analisi delle urine non è richiesta routinariamente, ma solo quando vi sia una indicazione basata sulla tossicità prevista o osservata.

Se i dati storici di base sono insufficienti, prima di iniziare il dosaggio si dovrebbe prendere in considerazione la determinazione dei parametri ematologici e di biochimica clinica.

Necroscopia macroscopica

Tutti gli animali dovrebbero essere sottoposti a necroscopia macroscopica completa, che include l'esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi e delle cavità cranica, toracica e addominale e dei loro contenuti. Il fegato, i reni, le ghiandole surrenali e i testicoli devono essere pesati umidi, appena possibile dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento. I seguenti organi e tessuti dovrebbero essere conservati in mezzo adatto per possibili esami istopatologici futuri: tutte le lesioni macroscopiche; cervello — comprese sezioni di midollo/ponte, corteccia cerebellare e corteccia cerebrale, pituitaria, tiroide/paratiroide, qualsiasi tessuto timico, (trachea), polmoni, cuore, aorta, ghiandole salivari, fegato, milza, reni, ghiandole surrenali, pancreas, gonadi, utero, organi genitali accessori, cistifellea (se esiste), esofago, stomaco, duodeno, digiuno, ileo, intestino cieco, colon, retto, vescica urinaria, linfonodi rappresentativi, (ghiandole mammarie femminili), (muscolatura della coscia), nervo periferico (occhi), (sterno con midollo osseo), (femore — compresa superficie articolare), (midollo spinale a tre livelli — cervicale, emitoracico e lombare) e (ghiandole lacrimali esorbitali). I tessuti citati tra parentesi devono essere esaminati solo se presentano sintomi di tossicità o se vi siano indicazioni che sono l'organo bersaglio coinvolto.

Esame istopatologico

a) L'esame istopatologico completo dovrebbe essere effettuato sulla cute normale e sulla cute trattata, e sugli organi e tessuti degli animali nel gruppo trattato con dosaggio elevato e nel gruppo di controllo;

b) tutte le lesioni macroscopiche dovrebbero essere esaminate;

([1]) Ora nota come alanina-aminotransferasi serica.
([2]) Ora nota come appartato-aminotransferasi serica.

▼B

c) gli organi bersaglio dovrebbero essere esaminati anche nei gruppi trattati con altre dosi;

d) quando si usano i ratti, si dovrebbe eseguire l'esame istopatologico dei polmoni degli animali dei gruppi trattati con dosaggi bassi e intermedi per l'individuazione di infezioni poiché ciò fornisce una valutazione appropriata dello stato di salute degli animali. Ulteriori esami istopatologici di routine possono non essere richiesti per gli animali di questi gruppi, ma devono sempre essere effettuati sugli organi che presentano lesioni nel gruppo trattato con dosi elevate;

e) quando si fa uso di un gruppo satellite, si dovrebbe eseguire l'esame istopatologico dei tessuti e degli organi che presentano lesioni in altri gruppi trattati.

2. **DATI**

I dati dovrebbero essere riassunti sotto forma di tabelle, indicando per ogni gruppo sperimentale il numero di animali all'inizio del saggio, il numero di animali che presentano lesioni, il tipo di lesioni e la percentuale degli animali che presentano ciascun tipo di lesione. I risultati dovrebbero essere valutati con un metodo statistico appropriato. Qualsiasi metodo statistico riconosciuto può essere utilizzato.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— specie, ceppo, origine, condizioni ambientali, dieta,

— condizione sperimentali,

— livello di dose (veicolo compreso, se utilizzato) e concentrazioni,

— dati sulla risposta tossica per sesso e per dose,

— livello senza effetto, quando possibile,

— tempo della morte (durante l'esperimento) oppure specificare se gli animali sono sopravvissuti fino alla conclusione della prova,

— descrizione degli effetti tossici o di altri effetti,

— tempo di osservazione di ogni segno anormale e successivo decorso,

— dati di alimentazione e sul peso corporeo,

— risultati oftalmologici,

— analisi ematologiche usate e risultati completi,

— analisi di biochimica clinica usati e risultati completi (compresi i risultati dell'analisi delle urine),

— risultati della necroscopia,

▼B

— descrizione particolareggiata di tutti di risultati istopatologici,

— elaborazione statistica dei risultati, quando possibile,

— discussione dei risultati,

— interpretazione dei risultati.

3.2. VALUTAZIONE ED INTERPRETAZIONE

Vedi introduzione generale, parte B.

4. **RIFERIMENTI**

Vedi introduzione generale, parte B.

▼**M4**

B.29. **TOSSICITÀ SUBACUTA PER INALAZIONE: STUDIO A 90 GIORNI**

▼**M9**

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼M4

B.30. **STUDI DI TOSSICITÀ CRONICA**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼B

B.31. **STUDIO DI TOSSICITÀ PRENATALE**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼M4

B.32. **STUDI DI CANCEROGENESI**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼**M4**

B.33. **STUDI COMBINATI DI TOSSICITÀ CRONICA/CANCEROGENESI**

▼**M9**

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼B

B.34. **SAGGIO DI TOSSICITÀ SULLA RIPRODUZIONE: UNA GENERAZIONE**

▼M9

Questo metodo di prova è stato soppresso in quanto non è più riconosciuto come idoneo per acquisire informazioni sulle proprietà tossicologiche delle sostanze chimiche ai fini del regolamento (CE) n. 1907/2006. I metodi di prova applicabili per l'endpoint in questione figurano nella tabella 2 della parte 0.

▼B

B.35. **STUDIO DI TOSSICITÀ RIPRODUTTIVA A DUE GENERAZIONI**

▼M9

Questo metodo di prova è stato soppresso in quanto non è più riconosciuto come idoneo per acquisire informazioni sulle proprietà tossicologiche delle sostanze chimiche ai fini del regolamento (CE) n. 1907/2006. I metodi di prova applicabili per l'endpoint in questione figurano nella tabella 2 della parte 0.

▼M4

B.36. **TOSSICOCINETICA**

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 417 (2010). Gli studi incentrati sulla tossicocinetica di una sostanza chimica si prefiggono di ottenere informazioni adeguate sull'assorbimento, la distribuzione, la biotrasformazione (ovvero il metabolismo) e l'escrezione della sostanza, di facilitare la comprensione della relazione tra la concentrazione, o la dose, e la tossicità osservata e di contribuire a comprendere il meccanismo attraverso il quale la sostanza chimica in esame esercita la propria tossicità. La tossicocinetica può aiutare a comprendere gli studi tossicologici dimostrando che l'esposizione degli animali da laboratorio alla sostanza in esame è di natura sistemica e rivelando quali siano i gruppi funzionali circolanti (composto progenitore/metaboliti). I principali parametri tossicocinetici ricavati dagli studi forniscono anche informazioni sul potenziale di accumulo della sostanza in esame nei tessuti e/o negli organi, come pure sul rischio di induzione di biotrasformazioni derivanti dall'esposizione alla sostanza.

2. I dati tossicocinetici possono essere utili per valutare se i dati di tossicità negli animali sono pertinenti ed adeguati ad essere estrapolati per valutare i pericoli e/o i rischi per gli esseri umani. Inoltre, gli studi tossicocinetici possono fornire informazioni utili a determinare i livelli di dose per gli studi di tossicità (cinetica lineare o non-lineare), gli effetti derivanti dalla via di somministrazione, la biodisponibilità e i problemi connessi all'impostazione dello studio. Alcuni tipi di dati tossicocinetici possono servire a elaborare dei modelli tossicocinetici su base fisiologica.

3. I dati tossicocinetici e metabolici sono importanti sotto diversi aspetti. Possono ad esempio fornire indicazioni su eventuali tossicità e modalità d'azione e su come queste interagiscono con i livelli di dose e la via di esposizione. Inoltre, i dati sul metabolismo possono fornire informazioni utili per valutare l'importanza, sul piano tossicologico, dell'esposizione a metaboliti esogeni della sostanza in esame.

4. La presenza di dati tossicocinetici adeguati aiuterà a confermare l'accettabilità e l'applicabilità dei metodi fondati sulle relazioni quantitative struttura-attività e le interpolazioni fondate sul metodo read-across o sul metodo del raggruppamento per valutare la sicurezza delle sostanze chimiche. I dati cinetici possono anche servire a valutare la rilevanza tossicologica di altri studi (ad esempio quelli in vivo/in vitro).

5. Salvo menzione contraria (cfr. in particolare i paragrafi da 74 a 78), il presente metodo di prova presuppone la somministrazione della sostanza in esame per via orale.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

6. Gli endpoint e i parametri tossicocinetici da misurare per le diverse classi di sostanze chimiche (ad esempio pesticidi, biocidi, sostanze chimiche industriali) sono diversi a seconda delle necessità e degli obblighi imposti dai diversi regimi normativi. Contrariamente alla maggior parte degli altri metodi di prova, il presente metodo descrive delle prove tossicocinetiche che comprendono misurazioni ed endpoint multipli. In futuro potranno essere sviluppati nuovi metodi di prova, e/o documenti di orientamento, per descrivere ciascun endpoint separatamente e più in dettaglio. Per quanto riguarda il presente metodo, la definizione di quali prove o quali valutazioni condurre è subordinata alle esigenze e/o ai bisogni dei singoli regimi normativi.

▼M4

7. Si possono allestire molti tipi di studi per valutare il comportamento tossicocinetico della sostanza in esame in riposta alle disposizioni normative. Tuttavia, a seconda delle particolari situazioni o esigenze normative, per valutare la sostanza in questione non sempre è necessario ricorrere a tutti i diversi studi a disposizione. L'impostazione di uno studio tossicocinetico deve essere sufficientemente flessibile, in modo da poter prendere in considerazione le caratteristiche della sostanza analizzata. In alcuni casi, sarà sufficiente esplorare solo una particolare serie di aspetti per prevenire i pericoli e i rischi associati alla sostanza. In alcune situazioni, è possibile estrarre dati tossicocinetici dalle valutazioni svolte per altri studi tossicologici, in altre, possono essere necessari studi tossicocinetici più approfonditi, a seconda dei regimi normativi e/o nel caso sia necessario rispondere a nuove questioni sorte nel corso della valutazione della sostanza.

8. Per migliorare la qualità delle analisi ed evitare un inutile ricorso ad animali, prima di svolgere le prove il laboratorio deve prendere in considerazione tutte le informazioni disponibili sulla sostanza e sui rilevanti metaboliti e analoghi. Le informazioni possono comprendere dati provenienti da altri metodi di prova pertinenti (studi in vivo, in vitro e/o valutazioni in silico). Per programmare lo studio e interpretare i risultati potrebbero risultare utili le proprietà fisico-chimiche, ad esempio: il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (espresso in valore log P_{OW}), la costante di dissociazione (pKa), l'idrosolubilità, la pressione di vapore e il peso molecolare di una sostanza. Li si può determinare utilizzando metodi idonei, descritti nei metodi di prova pertinenti.

LIMITI

9. Il presente metodo di prova non è stato concepito per casi particolari, quali femmine gravide o che allattano e relativa prole, né per valutare gli eventuali residui in animali da produzione alimentare esposti alla sostanza. Tuttavia, i dati ottenuti da uno studio allestito secondo il presente metodo possono fornire informazioni generali utili a impostare studi specifici per questo tipo di indagini. Il presente metodo di prova non è destinato a essere utilizzato per test sui nanomateriali. Una relazione sull'analisi preliminare delle linee guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche in merito alla loro applicabilità ai nanomateriali suggerisce che non sia possibile applicare a tali materiali la linea guida dell'OCSE n. 417 (equivalente al presente metodo B.36) (1).

DEFINIZIONI

10. Le definizioni utilizzate ai fini del presente metodo di prova sono fornite in appendice.

CONSIDERAZIONI SUL BENESSERE DEGLI ANIMALI

11. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 19 contiene delle indicazioni sul trattamento umano degli animali (2). Se ne raccomanda la consultazione per tutti gli studi in vivo e in vitro descritti nel presente metodo.

DESCRIZIONE DEI METODI

Studi pilota

12. Si raccomanda e incoraggia il ricorso a studi pilota per la scelta dei parametri sperimentali per gli studi tossicocinetici (es.: metabolismo, bilancio di massa, procedure analitiche, definizione delle dosi, esalazioni di CO_2 ecc.). Potrebbe non essere necessario ricorrere all'uso di sostanze chimiche radiomarcate per caratterizzare alcuni dei parametri elencati sopra.

▼M4

Scelta degli animali

Specie

13. Le specie (e i ceppi) animali utilizzati per le prove tossicocinetiche devono di preferenza essere identiche a quelle utilizzate in altri studi tossicologici svolti con la sostanza in esame. Normalmente viene utilizzato il ratto, in quanto specie ampiamente usata negli studi tossicologici. Il ricorso o l'aggiunta di altre specie possono essere giustificati se uno studio tossicologico importante ha dimostrato la presenza di tossicità rilevante nelle specie in questione o se è dimostrato che la loro tossicità/tossicocinetica è più pertinente per l'uomo. In caso di utilizzo di un'altra specie e ceppo è necessario motivare la scelta.

14. Salvo indicazioni contrarie, la specie scelta per il presente metodo di prova è il ratto. Se si fa ricorso ad altre specie, alcuni aspetti del metodo potrebbero necessitare di modifiche.

Età e ceppo

15. Gli animali utilizzati devono essere adulti giovani (normalmente, 6-12 settimane al momento della somministrazione) e sani (cfr. anche paragrafi 13 e 14). In caso non si utilizzino giovani adulti, è necessario motivare la scelta. All'inizio della prova gli animali devono essere nella stessa fascia di età. La variazione ponderale degli animali utilizzati deve essere minima e non superare il ± 20 % del peso medio di tutti gli animali interessati dallo studio. Idealmente, il ceppo usato sarà lo stesso di quello utilizzato per stabilire la banca dati tossicologica della sostanza in esame.

Numero e sesso degli animali

16. Ciascuna dose sperimentale va somministrata a un minimo di quattro animali dello stesso sesso. È necessario giustificare la scelta del sesso dell'animale. Occorre prendere in considerazione l'opportunità di ricorrere ad animali di entrambi i sessi (quattro maschi e quattro femmine) in presenza di dati che suffragano differenze tossicologiche significative legate al sesso.

Condizioni di stabulazione e alimentazione

17. Nel corso della prova gli animali vanno stabulati individualmente. La stabulazione in gruppo può essere giustificata in determinate circostanze. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C) con un'umidità relativa del 30-70 %. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua potabile.

Sostanza chimica in esame

18. Occorre usare una sostanza radiomarcata al ^{14}C per tutti gli aspetti dello studio che riguardano il bilancio di massa e l'identificazione dei metaboliti; tuttavia, nel caso sia dimostrato che:

— è possibile valutare adeguatamente il bilancio di massa e l'identificazione dei metaboliti utilizzando una sostanza chimica non marcata,

— la specificità analitica e la sensibilità del metodo che fa ricorso a una sostanza non radioattiva sono uguali o maggiori di quelle che si sarebbero ottenute con una sostanza radiomarcata,

▼M4

non è necessario utilizzare una sostanza radiomarcata. Inoltre, si può ricorrere ad altri isotopi radioattivi e stabili, in particolare se tali elementi sono responsabili della porzione tossica della sostanza in esame o ne fanno parte. Se possibile, il marcatore radioattivo deve collocarsi in quella porzione centrale della molecola che è metabolicamente stabile (vale a dire, non è scambiabile, non è rimossa metabolicamente come CO_2 e non è incorporata nell'insieme dei radicali monocarbonici dell'organismo). Per seguire il destino metabolico della sostanza in esame potrebbe essere necessario marcare vari punti o determinate regioni della sua molecola.

19. Le sostanze radiomarcate e non radiomarcate sono analizzate utilizzando metodi idonei a stabilirne purezza e identità. La radiopurezza della sostanza radioattiva in esame deve essere la massima raggiungibile per tale sostanza (idealmente, superiore al 95 %) ed è necessario fare un ragionevole sforzo per identificare eventuali impurità presenti in percentuale pari o superiore al 2 %. Nella relazione sulla prova vengono riportate la purezza, l'identità e l'eventuale percentuale di presenza di impurità. Alcuni regimi normativi possono fornire sia ulteriori orientamenti per la definizione e la caratterizzazione delle sostanze chimiche composte da miscele sia metodi per determinarne la purezza.

Scelta delle dosi

Studio pilota

20. Una dose unica somministrata per via orale è generalmente sufficiente per lo studio pilota. Va utilizzata una dose non tossica ma sufficientemente elevata da consentire l'identificazione dei metaboliti negli escreti (e nel plasma, se del caso) e da soddisfare lo scopo dichiarato dello studio pilota, come stabilito al paragrafo 12 del presente metodo.

Studio principale

21. Per gli studi principali, è preferibile ricorrere a un minimo di due dosi dato che le informazioni raccolte da almeno due gruppi-dose possono essere d'aiuto a stabilire le dosi da somministrare in altri studi di tossicità e per la valutazione dose-risposta nelle prove di tossicità già disponibili.

22. Se vengono somministrate due dosi, devono entrambe essere in dosaggio sufficientemente alto da consentire l'identificazione dei metaboliti negli escreti (e nel plasma, se del caso). Le informazioni provenienti dai dati sulla tossicità già disponibili vanno prese in considerazione al momento di scegliere la dose. Se non si dispone di informazioni (provenienti, ad esempio, da studi di tossicità acuta orale che indichino i segni clinici di tossicità, oppure da studi sulla tossicità da dosi ripetute), per la dose più elevata è possibile prendere in considerazione un valore inferiore alla stima della DL_{50} (per via orale e per via cutanea) o della CL_{50} (per inalazione) o inferiore al valore più basso nella gamma di valori sperimentali stimati di tossicità acuta. La dose più bassa corrisponderà a una frazione della dose più elevata.

23. Se viene utilizzato un solo livello di dose, sarà idealmente una dose sufficientemente elevata da consentire l'identificazione dei metaboliti negli escreti (e nel plasma, se del caso) anche senza produrre tossicità apparente. Occorre giustificare la decisione di non includere un secondo livello di dose.

24. Se è necessario stabilire gli effetti della dose sui processi cinetici, due dosi potrebbero non essere sufficienti e almeno una dose dovrebbe essere sufficientemente elevata da saturare tali processi. Se l'area sotto la curva «concentrazione plasmatica/tempo» (AUC) non è lineare nell'intervallo tra la somministrazione di due livelli di dose nello studio principale, si può chiaramente dedurre che la saturazione di uno (o più) dei processi cinetici avviene in un punto compreso tra questi due livelli di dose.

▼M4

25. Nel caso di sostanze di prova con bassa tossicità, va utilizzata una dose massima di 1 000 mg/kg di peso corporeo (per via orale e per via cutanea; se la somministrazione avviene per inalazione, cfr. capitolo B.2 del presente allegato; in quest'ultimo caso, generalmente, la dose non supera i 2 mg/l). Considerazioni specifiche relative a una determinata sostanza possono rendere necessaria una dose superiore, in funzione dei regimi normativi. Occorre sempre giustificare la scelta di una particolare dose.

26. I dati relativi alla tossicocinetica e alla distribuzione tissutale ottenuti a partire da una dose singola possono essere sufficienti per determinare il potenziale di accumulo e/o di persistenza. In alcune circostanze può essere tuttavia necessario somministrare dosi ripetute: i) per valutare più accuratamente il potenziale di accumulo e/o di persistenza o l'evoluzione dei parametri tossicocinetici (per esempio induzione e inibizione enzimatica); oppure, ii) per rispondere alle esigenze della normativa applicabile. Negli studi a dosi ripetute è generalmente sufficiente la somministrazione ripetuta di dosi basse, ma, in determinate circostanze, può essere necessario somministrare a più riprese dosi elevate (cfr. anche paragrafo 57).

Somministrazione della sostanza chimica in esame

27. È necessario sciogliere la sostanza in esame o prepararne una sospensione omogenea nello stesso veicolo utilizzato per gli altri studi di tossicità orale realizzati sulla sostanza con somministrazione mediante sonda, se il veicolo è conosciuto. La scelta del veicolo deve essere motivata. Quando si imposta lo studio è necessario prendere in considerazione la scelta del veicolo e il volume delle dosi. Il metodo consueto di somministrazione è tramite sonda gastrica; ciononostante, in casi specifici può essere più opportuno ricorrere a capsule di gelatina o a una somministrazione con la dieta (in entrambi i casi è necessario giustificare la scelta). È altrettanto necessario avvalersi di mezzi di verifica delle dosi effettivamente somministrate a ogni animale.

28. Il volume massimo dei liquidi da somministrare tramite sonda gastrica in una sola volta dipende dalla taglia degli animali, dal tipo di veicolo scelto per la dose e dalla soppressione o meno dell'alimentazione prima della somministrazione della sostanza in esame. Occorre giustificare la scelta di sospendere o continuare l'alimentazione prima della somministrazione della dose. Solitamente, va utilizzato il minor volume possibile sia per veicoli acquosi sia per veicoli non acquosi. Di norma, per i roditori il livello di dose non deve superare i 10 ml/kg di peso corporeo. Nel caso di sostanze più lipofile, il volume del veicolo utilizzato può essere di 4 ml/kg di peso corporeo o superiore. Nel caso di somministrazione ripetuta, quando il digiuno quotidiano è controindicato, occorre considerare l'uso di livelli di dose più bassi (per esempio, da 2 a 4 ml/kg di peso corporeo). Se possibile, prendere in considerazione la possibilità di utilizzare livelli di dose coerenti con quello somministrato in altri studi su sostanze chimiche in esame somministrate per via orale tramite sonda gastrica.

29. La somministrazione della sostanza in esame per via endovenosa e la misurazione del tenore della sostanza nel sangue e/o negli escreti può servire a determinare la biodisponibilità o l'assorbimento orale relativo. Per lo studio per via endovenosa, viene somministrata una dose singola della sostanza in esame (generalmente equivalente, ma non superiore, alla dose orale più bassa — cfr. «Scelta delle dosi») utilizzando un veicolo idoneo. La dose va somministrata in un volume adeguato (es. 1 ml/kg di peso corporeo) e nel sito prescelto ad almeno quattro animali di sesso adatto (si possono utilizzare animali di entrambi i sessi, giustificando la scelta, cfr. paragrafo 16). Per la somministrazione della sostanza in esame per via endovenosa, è necessario sciogliere completamente o preparare una soluzione in sospensione della dose. Fare in modo che il veicolo per la somministrazione per via endovenosa non interferisca col flusso sanguigno o con l'integrità delle

▼M4

cellule sanguigne. Se la sostanza viene infusa tramite un'apposita pompa, la velocità di somministrazione deve essere registrata e va standardizzata per tutti gli animali. È necessario ricorrere ad anestesia se si procede all'incanulamento della vena giugulare (per somministrare la sostanza in esame e/o per prelievo di sangue) o se per la somministrazione si fa ricorso all'arteria femorale. Considerare con attenzione il tipo di anestesia, in quanto può incidere sulla tossicocinetica. Gli animali devono potersi riprendere adeguatamente prima della somministrazione della sostanza chimica in esame incorporata nel veicolo.

30. Per determinate sostanze chimiche è possibile ricorrere ad altre vie di somministrazione (come le vie cutanee e l'inalazione, per esempio, cfr. paragrafi da 74 a 78), in funzione delle loro proprietà fisico-chimiche e l'utilizzo o la via di esposizione umana previsti.

Misurazioni

Bilancio di massa

31. Il bilancio di massa viene determinato in base alla somma della percentuale di dose (radioattiva) somministrata escreta nelle urine, nelle feci e nell'aria espirata, e della percentuale presente nei tessuti, nel resto della carcassa e nell'acqua di risciacquo delle gabbie (cfr. paragrafo 46). In generale, sono considerati adeguati i recuperi totali della sostanza chimica (radioattività) somministrata superiori al 90 %.

Assorbimento

32. È possibile calcolare una stima iniziale dell'assorbimento escludendo dal bilancio di massa la percentuale della dose nel tratto gastrointestinale e/o nelle feci. Per il calcolo della percentuale di assorbimento, cfr. paragrafo 33. Per l'analisi degli escreti, cfr. paragrafi da 44 a 49. Se non è possibile stabilire con esattezza, per mezzo di un bilancio di massa, l'assorbimento conseguente a una somministrazione per via orale (per esempio se più del 20 % della dose somministrata è presente nelle feci), può essere necessario procedere a studi più approfonditi che possono includere: 1) la somministrazione per via orale della sostanza in esame e la misurazione della sostanza nella bile; oppure 2) la somministrazione per via orale e per endovena della sostanza in esame e la misurazione della quantità netta di sostanza presente nelle urine, più quella nell'aria espirata e più quella nella carcassa, per ciascuna delle due vie citate. In entrambi gli studi, la misurazione della radioattività è utilizzata come metodo sostitutivo all'analisi specifica della sostanza chimica in esame e dei suoi metaboliti.

33. Per lo studio dell'escrezione biliare, la sostanza in esame viene somministrata generalmente per via orale. In questo tipo di studio, è necessario incanulare le vie biliari di almeno quattro animali di sesso adatto (o di entrambi i sessi, giustificando la scelta) e somministrare una dose singola della sostanza in esame. Dopo la somministrazione della sostanza, occorre monitorare l'escrezione di radioattività/sostanza in esame nella bile per il tempo necessario a stimare la percentuale della dose somministrata che viene escreta per questa via, in modo da calcolare direttamente a partire da questo dato la percentuale dell'assorbimento per via orale, nel modo seguente:

$$\text{Percentuale di assorbimento} = \begin{array}{l}(\text{quantità presente nella bile} + \text{nell'urina} \\ +\text{nell'aria espirata} + \text{nella carcassa, esclusa la} \\ \text{quantità presente nel tratto gastrointestinale})/ \\ \text{quantità somministrata} \times 100\end{array}$$

34. Per alcune classi di sostanze la dose assorbita può essere secreta direttamente attraverso le membrane intestinali. In questi casi, la misurazione della percentuale della dose presente nelle feci dopo la somministrazione orale in ratti con dotto biliare incanulato non è considerata rappresentativa della dose non assorbita. Nei casi in cui si presume avvenga una secrezione intestinale, si raccomanda di basare il calcolo della percentuale della dose assorbita a partire dall'assorbimento calcolato, confrontando l'escrezione a seguito di somministrazione per via orale e l'escrezione tramite somministrazione per via endovenosa (in ratti intatti o con dotto biliare incanulato) (cfr. paragrafo 35). Inoltre, quando la quantificazione della secrezione intestinale è considerata necessaria, si consiglia di misurare l'escrezione presso ratti con dotto biliare incanulato dopo aver somministrato la dose per via endovenosa.

▼M4

Biodisponibilità

35. La biodisponibilità può essere determinata a partire dalla cinetica plasmatica/sanguigna dei gruppi esposti per via orale e per via endovenosa, come descritto ai paragrafi 50-52, attraverso analisi chimiche specifiche della sostanza in esame e/o del o dei metaboliti corrispondenti, evitando, pertanto, di ricorrere alla radiomarcatura della sostanza in causa. Per calcolare la biodisponibilità (F) della sostanza chimica in esame oppure del metabolita o dei metaboliti corrispondenti, ricorrere a questa formula:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dose_{IV}/Dose_{exp})$$

dove «AUC» è l'area sotto la curva «concentrazione plasmatica/tempo», mentre «exp» è la via di somministrazione sperimentale (orale, cutanea, inalatoria).

36. Nella valutazione del rischio legato ad effetti sistemici, è generalmente preferibile ricorrere alla biodisponibilità del componente tossico, invece che alla percentuale di assorbimento, per confrontare le concentrazioni sistemiche ricavate da studi sugli animali con dati analoghi di biomonitoraggio provenienti da studi sull'esposizione professionale. La situazione può diventare più complessa se le dosi si situano nell'intervallo di risposta non lineare; è quindi importante che un precedente studio tossicocinetico consenta di scegliere una gamma di dosi con risposta nell'intervallo lineare.

Distribuzione tissutale

37. È importante conoscere la distribuzione tissutale della sostanza in esame e/o dei suoi metaboliti per poter identificare i tessuti bersaglio, comprendere i meccanismi soggiacenti alla tossicità e per poter ottenere informazioni sul potenziale di accumulo e di persistenza della sostanza e dei metaboliti. La percentuale della dose (radioattiva) totale nei tessuti e nel resto della carcassa va misurata per lo meno al termine dello studio di escrezione (vale a dire, di solito, fino a 7 giorni dopo la somministrazione della dose, oppure prima in funzione del comportamento specifico della sostanza in esame). Se alla fine dello studio non si rileva la presenza della sostanza nei tessuti (ad esempio nel caso in cui la sostanza sia stata eliminata prima della fine dello studio a causa di un'emivita breve) occorre prestare particolare attenzione per evitare una scorretta interpretazione dei dati. In situazioni simili, la distribuzione tissutale deve essere analizzata quando si raggiunge la concentrazione massima nel plasma/nel sangue (T_{max}) oppure il picco dell'escrezione urinaria della sostanza chimica in esame (e/o dei metaboliti), a seconda del caso (cfr. paragrafo 38). Inoltre, può essere necessario raccogliere tessuti anche in altri momenti in modo da poter determinare la distribuzione della sostanza in esame e/o dei metaboliti nei tessuti, valutare la dipendenza temporale (se del caso), aiutare a stabilire il bilancio di massa e/o se ciò è richiesto da un'autorità competente. I tessuti da prelevare comprendono fegato, grasso, tratto gastrointestinale, reni, milza, sangue intero, residuo della carcassa, tessuti dell'organo bersaglio ed altri eventuali tessuti (es. tiroide, eritrociti, organi riproduttivi, pelle e — in particolare negli animali pigmentati — occhi) potenzialmente importanti per la valutazione tossicologica della sostanza in esame. Occorre analizzare la più ampia gamma possibile di tessuti negli stessi momenti, per sfruttare al massimo l'uso degli animali e nell'eventualità che, negli studi di tossicità cronica e subcronica, si osservino effetti tossici nell'organo bersaglio. Vanno inoltre registrate la concentrazione del residuo (radioattivo) e le relazioni percentuali tra concentrazione nei tessuti e nel plasma (nel sangue).

38. È inoltre possibile che la valutazione della distribuzione tissutale in ulteriori momenti — ad esempio nel momento della concentrazione di picco nel plasma/nel sangue (es. T_{max}) o al massimo dell'escrezione urinaria — ottenuta, rispettivamente, a partire da studi di cinetica plasmatica/sanguigna o da studi sull'escrezione, possa essere necessaria a un'autorità competente o venga richiesta da quest'ultima. Si tratta di un'informazione che può aiutare a comprendere la tossicità e il potenziale di accumulo e di persistenza della sostanza in esame e dei metaboliti. Occorre giustificare la scelta dei campioni; i campioni da sottoporre ad analisi devono solitamente essere uguali a quelli indicati sopra (cfr. paragrafo 37).

▼M4

39. Negli studi sulla distribuzione tissutale è possibile quantificare la radioattività ricorrendo a dissezione, omogeneizzazione, combustione e/o solubilizzazione degli organi, seguite da conteggio in scintillazione liquida dei residui intrappolati. Altre tecniche (es. autoradiografia quantitativa a corpo intero e microautoradiografia dei recettori), attualmente a diversi livelli di sviluppo, potrebbero dimostrarsi utili per determinare la distribuzione di una sostanza chimica negli organi e/o nei tessuti (3) (4).

40. Per le vie d'esposizione che non siano quella orale, occorre prelevare e analizzare tessuti specifici, ad esempio i polmoni negli studi che prevedono la somministrazione per via inalatoria e la pelle in quelli con somministrazione per via cutanea. Cfr. paragrafi da 74 a 78.

Metabolismo

41. È necessario raccogliere escreti (e plasma, se del caso) per procedere all'identificazione e alla quantificazione di una sostanza chimica e dei suoi metaboliti, non modificati, come descritto ai paragrafi da 44 a 49. È accettabile raggruppare gli escreti per facilitare l'identificazione dei metaboliti in seno a un determinato gruppo-dose. Si raccomanda di stabilire il profilo dei metaboliti per ogni fase dello studio. Tuttavia, se l'assenza di campioni o di radioattività impedisce di farlo, è accettabile raggruppare l'urina e le feci raccolte in diversi momenti, ma provenienti solo da animali dello stesso sesso che abbiano ricevuto la stessa dose. Utilizzare metodi qualitativi e quantitativi appropriati per le analisi delle urine, delle feci e della radioattività espirata nonché, se del caso, della bile degli animali esposti.

42. Occorre fare un ragionevole sforzo per identificare tutti i metaboliti presenti in una percentuale uguale o superiore al 5 % della dose somministrata e tracciare uno schema metabolico per la sostanza in esame. Se la quantità della sostanza chimica in esame presente negli escreti è pari o superiore al 5 % della dose somministrata, la sostanza chimica va identificata. Con «identificata» si intende che venga determinata la struttura esatta dei suoi componenti. Normalmente, l'identificazione avviene effettuando simultaneamente una co-cromatografia del metabolita e dei modelli conosciuti, usando due sistemi diversi, oppure utilizzando tecniche in grado di determinare con sicurezza la struttura come la spettrometria di massa, la risonanza magnetica nucleare ecc. Nel caso della co-cromatografia, i metodi cromatografici che utilizzano la stessa fase stazionaria con due sistemi di solventi diversi non sono considerati adeguati per verificare l'identità dei metaboliti in quanto i due sistemi non sono indipendenti. L'identificazione tramite co-cromatografia va ottenuta utilizzando due sistemi diversi e indipendenti sul piano analitico, come ad esempio la cromatografia su strato sottile (TLC) in fase normale o inversa, oppure la cromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni (HPLC). Se la qualità della separazione cromatografica è adeguata, non è necessario ottenere un'ulteriore conferma tramite mezzi spettroscopici. Per un'identificazione inequivocabile è possibile ricorrere anche a metodi che forniscono informazioni strutturali: cromatografia in fase liquida/spettrometria di massa (LC-MS), oppure cromatografia in fase liquida/spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS), gascromatografia/spettrometria di massa (GC-MS) e spettrometria di risonanza magnetica nucleare.

43. Se non è possibile procedere all'identificazione dei metaboliti che rappresentano, individualmente, il 5 % od oltre della dose somministrata è necessario fornire una giustificazione/spiegazione di questo fatto nella relazione finale. Potrebbe essere utile identificare i metaboliti che rappresentano meno del 5 % della dose somministrata per migliorare la comprensione della via metabolica per la valutazione dei rischi e/o dei pericoli della sostanza in esame. Ogniqualvolta possibile, è necessario fornire la conferma della struttura dei metaboliti, che potrebbe rendere necessario stabilire il profilo metabolico nel plasma, nel sangue o in altri tessuti.

▼M4

Escrezione

44. Il tasso e il grado di escrezione della sostanza somministrata devono essere determinati attraverso la misurazione della percentuale di dose (radioattiva) recuperata dalle urine, dalle feci e dall'aria espirata. Si tratta di dati utili anche per stabilire il bilancio di massa. Le quantità della sostanza (radioattività) in esame eliminate nelle urine, nelle feci e nell'aria espirata devono essere determinate ad intervalli appropriati (cfr. paragrafi da 47 a 49). Gli esperimenti a dosi ripetute devono essere appositamente impostati, in modo da consentire la raccolta di dati sugli escreti sufficienti a raggiungere gli obiettivi stabiliti al paragrafo 26. Ciò consentirà di poterli confrontare con quelli degli esperimenti con dose unica.

45. Se lo studio pilota dimostra che la quantità di sostanza in esame (radioattività) escreta nell'aria espirata non è significativa (secondo il paragrafo 49), per lo studio definitivo non sarà necessario raccogliere l'aria espirata.

46. Ciascun animale viene collocato in un'unità metabolica separata per la raccolta degli escreti (urina, feci, aria espirata). Alla fine di ciascun periodo di raccolta (cfr. paragrafi da 47 a 49), le unità metaboliche vanno risciacquate con un solvente adeguato («acqua di risciacquo») per assicurare il massimo recupero della sostanza in esame (radioattività). La raccolta degli escreti termina in capo a sette giorni o dopo aver recuperato almeno il 90 % della dose, a seconda di quale eventualità si verifica per prima.

47. La quantità totale della sostanza in esame (radioattività) nelle urine dev'essere determinata almeno due volte nel corso della prima giornata di raccolta (una delle quali 24 ore dopo la somministrazione della dose) per poi continuare una volta al giorno fino alla fine dello studio. Per la prima giornata, si raccomanda di optare per più di due momenti di campionamento (ad esempio dopo 6, 12 e 24 ore). I risultati degli studi pilota vanno analizzati per trarre informazioni sull'opportunità di introdurre momenti di raccolta diversi o supplementari. È necessario giustificare la scelta del calendario adottato.

48. La quantità totale della sostanza in esame (radioattività) nelle feci dev'essere determinata una volta al giorno, a partire da 24 ore dopo la somministrazione della dose e fino alla fine dello studio, salvo indicazioni contrarie provenienti dagli studi pilota che suggeriscano di svolgere raccolte più frequenti o in altri momenti. È necessario giustificare la scelta di un calendario alternativo.

49. Se in un determinato studio meno dell'1 % della dose somministrata viene rilevata nell'aria espirata raccolta in un periodo di 24 ore, la raccolta di CO_2 espirata e di altri materiali volatili può essere sospesa.

Studi in funzione del tempo

Cinetica plasmatica/sanguigna

50. Lo scopo di questi studi è di ottenere delle stime relative ai principali parametri tossicocinetici della sostanza in esame [es.: C_{max}, T_{max}, emivita ($t_{1/2}$), AUC]. È possibile svolgere gli studi somministrando una dose unica, ma generalmente se ne somministrano due o più. Le dosi vengono stabilite a seconda della natura e/o dell'oggetto dello studio. I dati cinetici possono essere necessari per risolvere questioni quali la biodisponibilità della sostanza in esame e/o per chiarire gli effetti della dose sull'eliminazione (vale a dire, per chiarire se la saturazione dell'eliminazione dipende o meno dalla dose).

51. Per questo tipo di studi, devono essere usati almeno quattro animali dello stesso sesso per ogni gruppo-dose. È necessario giustificare la scelta del sesso degli animali. Occorre prendere in considerazione l'opportunità di ricorrere ad animali di entrambi i sessi (quattro maschi e quattro femmine) in presenza di dati che suffragano differenze tossicologiche significative legate al sesso.

▼M4

52. Dopo la somministrazione della sostanza (radiomarcata), utilizzare un metodo di campionamento adeguato per prelevare campioni di sangue da ogni animale in momenti idonei. Eventuali potenziali effetti del campionamento ripetuto sulla salute/fisiologia degli animali e/o la sensibilità del metodo analitico potrebbero limitare il volume e il numero di campioni di sangue da prelevare da ciascun animale. Devono essere sottoposti ad analisi campioni provenienti da ogni singolo animale. In determinate circostanze (ad esempio per la caratterizzazione dei metaboliti), può essere necessario raggruppare i campioni provenienti da diversi animali. I campioni raggruppati devono essere chiaramente identificati e occorre fornire una spiegazione per la scelta del raggruppamento. Se si utilizza una sostanza chimica radiomarcata, può essere opportuno determinare la radioattività totale presente. In tal caso, la radioattività totale deve essere analizzata nel sangue intero e nel plasma o nel plasma e negli eritrociti, per poter calcolare il rapporto sangue/plasma. In altre circostanze, potrebbero essere necessari studi più approfonditi che includano l'identificazione del composto progenitore e/o dei metaboliti o la valutazione della fissazione alle proteine.

Altri studi di cinetica tissutale

53. Questi studi si propongono di ottenere informazioni sull'evoluzione nel tempo, per chiarire questioni legate ad aspetti quali il meccanismo dell'azione tossica, il bioaccumulo e la biopersistenza, determinando i livelli della sostanza chimica in esame nei vari tessuti. I tipi di tessuti selezionati e il numero di momenti da sottoporre a valutazione dipenderanno dagli aspetti oggetto dello studio e dalla base dei dati tossicologici disponibili per la sostanza chimica in esame. Il disegno di questi ulteriori studi di cinetica tissutale deve tenere conto delle informazioni raccolte seguendo le indicazioni dei paragrafi da 37 a 40. Gli studi possono essere condotti somministrando una dose unica o dosi ripetute. Occorre fornire una giustificazione dettagliata dell'approccio scelto.

54. Le ragioni che possono giustificare il ricorso a ulteriori studi cinetici comprendono:

— indicazioni di una emivita prolungata nel sangue, che suggeriscono la possibilità di un accumulo della sostanza nei diversi tessuti, oppure

— l'interesse a verificare se è stato raggiunto uno stadio stazionario in determinati tessuti (ad esempio, negli studi a somministrazione ripetuta, sebbene possa sembrare che la concentrazione della sostanza in esame nel sangue abbia raggiunto uno stato apparentemente stazionario, può essere utile confermare se sia stata raggiunta la stessa concentrazione stazionaria anche nei tessuti bersaglio).

55. Per questo tipo di studi in funzione del tempo, occorre somministrare per via orale una dose adeguata della sostanza chimica in esame ad almeno quattro animali, per ciascuna dose e per punto temporale, e sorvegliare l'evoluzione nel tempo della distribuzione nei tessuti selezionati. Si utilizzano animali dello stesso sesso, salvo se si è osservata una tossicità specifica legata al sesso. A seconda dell'oggetto dello studio, si procederà o meno all'analisi della radioattività totale o della sostanza madre e/o dei metaboliti. Utilizzare tecniche idonee per valutare la distribuzione tissutale.

Induzione/Inibizione enzimatica

56. In uno o più dei casi elencati di seguito può essere necessario svolgere studi sui possibili effetti dell'induzione/inibizione enzimatica o della biotrasformazione della sostanza in esame:

1) se alcuni elementi indicano una possibile relazione tra biotrasformazione della sostanza in esame e aumento della tossicità;

2) se i dati sulla tossicità disponibili segnalano una relazione non lineare tra dose e metabolismo;

▼M4

3) se gli studi sull'identificazione dei metaboliti identificano un metabolita potenzialmente tossico che può essere stato prodotto da una via enzimatica indotta dalla sostanza chimica in esame;

4) per spiegare effetti che si presume siano legati a fenomeni di induzione enzimatica;

5) in caso di esperimenti in vitro o in vivo con specie e in condizioni diverse, se vengono osservate alterazioni tossicologiche rilevanti nel profilo metabolico della sostanza in esame, può essere necessario caratterizzare l'enzima o gli enzimi coinvolti (per esempio, enzimi di fase I come gli isoenzimi del sistema della monoossigenasi dipendente dal citocroma P450, enzimi di fase II come gli isoenzimi della uridina difosfato glucoronil-transferasi, o ogni altro enzima pertinente). Queste informazioni possono essere utilizzate per valutare la pertinenza delle specie in causa per le estrapolazioni inter-specie.

57. Per valutare le variazioni tossicocinetiche legate alla sostanza in esame, è necessario utilizzare protocolli di studio adeguati, debitamente convalidati e giustificati. Il disegno dello studio può ad esempio prevedere la somministrazione di dosi ripetute di una sostanza non marcata, seguite da una dose unica radiomarcata somministrata il 14° giorno, oppure la somministrazione di dosi ripetute con una sostanza radiomarcata con campionamenti il 1°, 7° e 14° giorno in modo da determinare il profilo dei metaboliti. La somministrazione di dosi ripetute della sostanza chimica radiomarcata, inoltre, può fornire informazioni sul bioaccumulo (cfr. paragrafo 26).

METODI COMPLEMENTARI

58. Altri metodi, al di là degli esperimenti in vivo descritti in questo metodo di prova, possono fornire informazioni utili su assorbimento, distribuzione, metabolismo o eliminazione delle sostanze chimiche in determinate specie.

Uso dei dati ottenuti in vitro

59. Utilizzando sistemi di prova adeguati è possibile studiare in vitro molti aspetti del metabolismo della sostanza in esame. Si può ricorrere a epatociti isolati di fresco o coltivati, oppure a frazioni subcellulari (es.: microsomi e citosol o frazione S9) epatiche per studiare i possibili metaboliti. Il metabolismo locale nell'organo bersaglio, ad esempio il polmone, può fornire indicazioni interessanti per la valutazione dei rischi. A tal fine, possono essere utili frazioni microsomiali dei tessuti bersaglio. Gli studi che ricorrono ai microsomi possono servire a indagare potenziali differenze dovute al genere o alle fasi di vita e a caratterizzare i parametri enzimatici (K_m e V_{max}) che possono essere d'aiuto nella valutazione della dose-dipendenza del metabolismo rispetto ai livelli di esposizione. Inoltre, i microsomi possono essere utili nell'identificazione degli enzimi microsomiali specifici coinvolti nel metabolismo della sostanza in esame, un aspetto che può rivelarsi importante per le estrapolazioni inter-specie (cfr. anche paragrafo 56). È inoltre possibile esaminare il potenziale di induzione della biotrasformazione utilizzando frazioni subcellulari epatiche (es. microsomi e citosol) di animali pretrattati con la sostanza in questione, attraverso studi di induzione sugli epatociti in vitro o a partire da determinate linee cellulari che esprimono degli enzimi pertinenti. In determinate circostanze e in condizioni adeguate, le frazioni subcellulari provenienti da tessuti umani possono essere prese in considerazione ed essere utilizzate per determinare eventuali differenze tra specie a livello di biotrasformazione. I risultati degli studi in vitro possono essere utili anche per sviluppare modelli tossicocinetici su base fisiologica (5).

▼M4

60. A partire da studi in vitro sull'assorbimento cutaneo, si possono ottenere informazioni supplementari per caratterizzare l'assorbimento (6).

61. È possibile utilizzare colture cellulari primarie da cellule epatiche e campioni tissutali freschi per chiarire questioni simili a quelle studiate ricorrendo a microsomi epatici. In alcuni casi, si potrebbero trovare risposte a determinate questioni utilizzando linee cellulari che esprimano specificamente l'enzima in causa, o linee cellulari geneticamente modificate. In altri casi, può essere utile studiare in vitro l'inibizione e l'induzione di isoenzimi specifici del citocroma P450 (es. CYP1A1, 2E1, 1A2, e altri) e/o di enzimi di fase II, attraverso il composto progenitore. Le informazioni ottenute possono dimostrarsi utili per composti di struttura simile.

Uso di dati tossicocinetici provenienti da studi di tossicità quali informazioni complementari

62. Le analisi di campioni di sangue, tessuti e/o escreti svolte all'interno di altri studi di tossicità possono fornire dati su biodisponibilità, cambiamenti nella concentrazione plasmatica in funzione del tempo (AUC, C_{max}), potenziale di bioaccumulo, tassi di eliminazione e cambiamenti nel metabolismo e nella cinetica legati al genere o alle fasi di vita.

63. Si possono effettuare modifiche a livello di impostazione dello studio per rispondere a domande concernenti: la saturazione delle vie di assorbimento, di biotrasformazione o di escrezione a dosi più elevate; il funzionamento di nuove vie metaboliche a dosi più elevate; la limitazione dei metaboliti tossici, sempre a dosi più elevate.

64. Si possono affrontare anche altre considerazioni legate alla valutazione dei rischi:

— la sensibilità in funzione dell'età, dovuta alle differenze nello stato della barriera emato-encefalica, a livello dei reni e/o delle capacità di detossificazione,

— la sensibilità di determinate sottopopolazioni dovuta a differenze nella capacità di biotrasformazione o ad altre differenze tossicocinetiche,

— il grado di esposizione fetale per trasferimento transplacentare delle sostanze chimiche o l'esposizione neonatale attraverso l'allattamento.

Uso dei modelli tossicocinetici

65. I modelli tossicocinetici possono essere utili per diversi aspetti della valutazione dei rischi e dei pericoli, ad esempio nella previsione dell'esposizione sistemica e della dose trasmessa ai tessuti interni. Inoltre, possono servire per chiarire determinate questioni relative alle modalità d'azione, potendo fungere da base per estrapolazioni interspecie, tra vie di esposizione, tra dosaggi, e per la valutazione dei rischi per l'uomo. Tra i dati utili per l'elaborazione di modelli tossicocinetici su base fisiologica per una sostanza chimica in esame in una determinata specie si trovano: 1) i coefficienti di ripartizione; 2) le costanti biochimiche e i parametri fisiologici; 3) i parametri di assorbimento specifico per via di esposizione; e 4) i dati cinetici in vivo per la valutazione dei modelli [ad esempio i parametri di eliminazione per le vie di escrezione pertinenti (> 10 %) nonché K_m e V_{max} per il metabolismo]. I dati sperimentali usati per elaborare il modello devono essere generati ricorrendo a metodi scientificamente solidi e i risultati ottenuti dall'applicazione del modello devono essere convalidati. Per facilitare l'elaborazione di modelli non compartimentali o a base fisiologica (7) vengono spesso determinati parametri specifici a una sostanza chimica o a una specie in esame, quali i tassi di assorbimento, il coefficiente di ripartizione sangue-tessuto e le costanti di velocità metabolica.

▼M4

DATI E RELAZIONE

66. Si raccomanda di inserire un indice nella relazione.

Corpo della relazione

67. Il corpo della relazione deve includere le informazioni previste dal presente metodo di prova, organizzate nelle sezioni e nei paragrafi descritti di seguito.

Sintesi

68. Occorre esporre sinteticamente l'impostazione dello studio e il metodo usato. È altrettanto necessario evidenziare i risultati principali concernenti il bilancio di massa, la natura e l'importanza dei metaboliti, i residui nei tessuti, il tasso di eliminazione, il potenziale di bioaccumulo, le differenze legate al sesso ecc. La sintesi dev'essere dettagliata a sufficienza da consentire una valutazione dei risultati.

Introduzione

69. In questa sezione si presentano gli obiettivi dello studio, le ragioni alla sua base e l'impostazione sperimentale, come pure i riferimenti pertinenti ed eventuali cenni storici.

Materiali e metodi

70. Vanno descritte in dettaglio tutte le informazioni pertinenti, in particolare:

a) sostanza chimica in esame

È necessario includere l'identificazione del prodotto chimico, che deve comprendere: denominazione chimica, struttura molecolare, composizione chimica qualitativa e quantitativa, grado di purezza chimica e, se possibile, tipo e quantità delle eventuali impurità. Occorre inoltre includere informazioni sulle proprietà fisico-chimiche, incluso stato fisico, colore, grado lordo di solubilità e/o coefficiente di ripartizione, stabilità e, se del caso, corrosività. Se del caso, fornire informazioni sugli isomeri. Se la sostanza chimica è radiomarcata, vanno indicati: il tipo di radionuclide, la posizione della marcatura, l'attività specifica e il grado di purezza radiochimica.

Si deve indicare il tipo o la descrizione dei veicoli, dei diluenti, degli agenti di sospensione e degli emulsionanti o di altri materiali utilizzati per somministrare la sostanza in esame;

b) animali da laboratorio

È necessario fornire informazioni sugli animali utilizzati per la prova, incluse quelle sulla selezione, giustificandola, della specie, del ceppo, dell'età all'inizio dello studio, del sesso, insieme a informazioni su peso corporeo, stato di salute e condizioni di allevamento;

c) metodi

Occorre fornire dettagli sull'impostazione dello studio e sulla metodologia utilizzata, includendo:

1) una giustificazione delle eventuali modifiche alla via e, se del caso, alle condizioni di esposizione;

▼M4

2) una giustificazione della scelta dei livelli della dose;

3) la descrizione degli studi pilota sottesi al disegno sperimentale degli studi di follow-up, se del caso, allegando i dati di supporto provenienti dagli studi pilota;

4) la modalità di preparazione della soluzione somministrata, il tipo di solvente o veicolo, se utilizzato;

5) il numero dei gruppi esposti e il numero degli animali per ciascun gruppo;

6) il livello e il volume delle dosi (e attività specifica in caso di utilizzo di marcatori radioattivi);

7) la o le vie e i metodi di somministrazione;

8) la frequenza di somministrazione;

9) il periodo di digiuno (se del caso);

10) la radioattività totale per animale;

11) la manipolazione degli animali;

12) la raccolta e il trattamento dei campioni;

13) i metodi d'analisi utilizzati per la separazione, quantificazione e identificazione dei metaboliti;

14) i limiti di rivelabilità per i metodi utilizzati;

15) le altre misure e procedure sperimentali utilizzate (inclusa la validazione dei metodi per l'analisi dei metaboliti);

d) analisi statistica

Se per analizzare i risultati degli studi si ricorre all'analisi statistica, la relazione deve includere sufficienti informazioni sul metodo di analisi e sul programma informatico utilizzati, in maniera tale che un revisore o un esperto di statistica indipendente possa rivalutare e ricostruire l'analisi.

Nel caso si ricorra a una modellizzazione sistemica, utilizzando ad esempio modelli tossicocinetici su base fisiologica, la presentazione dei modelli deve includerne una descrizione completa in modo da poterli ricostruire e convalidare in modo indipendente (cfr. paragrafo 65 e l'appendice «Definizioni»).

Risultati

71. I dati vanno riportati sinteticamente in una tabella, con una valutazione statistica idonea e una descrizione. Quelli relativi al conteggio della radioattività devono essere sintetizzati e presentati nel modo più consono allo studio, in genere in microgrammi o milligrammi equivalenti per massa del campione, sebbene sia possibile utilizzare altre unità. In questa sezione della relazione vanno inserite le illustrazioni grafiche dei risultati, la riproduzione dei dati cromatografici e spettrometrici, l'identificazione/quantificazione dei metaboliti e le vie metaboliche proposte, ivi compresa la struttura molecolare dei metaboliti. Inoltre, ove pertinenti, vanno incluse le informazioni elencate di seguito:

1) quantità e recupero percentuale della radioattività nelle urine, nelle feci, nell'aria espirata e nell'acqua di risciacquo delle urine e delle feci dalle gabbie.

— Per gli studi per via cutanea, è inoltre necessario includere i dati sul recupero della sostanza dalla cute trattata e dai lavaggi della cute, i dati relativi alla radioattività residua nella copertura protettiva della pelle e nell'unità metabolica, nonché i risultati dello studio sul lavaggio cutaneo; per ulteriori informazioni, cfr. paragrafi da 74 a 77,

▼M4

— per gli studi per via inalatoria, includere anche i dati sul recupero della sostanza in esame nei polmoni e nei tessuti nasali (8); per ulteriori informazioni, cfr. paragrafo 78;

2) distribuzione nei tessuti, espressa in percentuale della dose somministrata e come concentrazione (microgrammi equivalenti per grammo di tessuto) e rapporti tessuto/sangue o tessuto/plasma;

3) bilancio di materia elaborato per ciascuno studio, che implica l'analisi dei tessuti e degli escreti;

4) concentrazione del plasma e parametri tossicocinetici (biodisponibilità, AUC, C_{max}, T_{max}, eliminazione, emivita) della sostanza dopo la somministrazione attraverso la o le vie di esposizione pertinenti;

5) tasso e grado di assorbimento della sostanza chimica in esame dopo la somministrazione attraverso la o le vie di esposizione pertinenti;

6) quantità della sostanza chimica e dei metaboliti (espressa in percentuale della dose somministrata) raccolta negli escreti;

7) riferimento ai dati sugli animali presentati in allegato per tutti i parametri e gli endpoint misurati (ad esempio, dose somministrata, percentuale di recupero, concentrazioni, parametri tossicocinetici ecc.).

8) grafico sul quale figurano le vie metaboliche proposte e la struttura metabolica dei metaboliti.

Discussione dei risultati e conclusioni

72. In questa sezione della relazione l'autore, o gli autori, devono:

1) proporre la via metabolica, basata sui risultati del metabolismo e sull'eliminazione della sostanza chimica in esame;

2) esaminare le eventuali differenze legate alla specie e al sesso, rispetto all'eliminazione e/o alla biotrasformazione della sostanza chimica in esame;

3) presentare sotto forma di tabella ed esaminare l'identità e l'importanza dei metaboliti, i tassi di eliminazione, il potenziale di bioaccumulo e il livello dei residui tissutali del composto progenitore e/o del o dei metaboliti, oltre a eventuali alterazioni dei parametri tossicocinetici in funzione della dose;

4) integrare in questa sezione eventuali dati tossicocinetici pertinenti, ottenuti nel corso dello svolgimento degli studi di tossicità;

5) fornire una conclusione concisa, giustificata dai risultati dello studio;

6) aggiungere altre sezioni, se necessario.

73. Le eventuali ulteriori sezioni possono servire ad includere informazioni bibliografiche a sostegno degli studi, tabelle, grafici, appendici ecc.

▼M4

VIE DI ESPOSIZIONE ALTERNATIVE

Via cutanea

Esposizione per via cutanea

74. Questa sezione contiene indicazioni specifiche per studi di tossicocinetica sulla sostanza in esame somministrata per via cutanea. Per quanto riguarda l'assorbimento cutaneo, consultare il capitolo B.44 del presente allegato: Assorbimento cutaneo: metodo in vivo (9). Per altri endpoint, quali la distribuzione e il metabolismo, è possibile utilizzare il presente metodo di prova (B.36). Nell'esposizione per via cutanea, è possibile utilizzare uno o più livelli di dose della sostanza chimica in esame. La sostanza chimica in esame (sostanza chimica pura, diluita o formulazione che la contenga, da applicare sulla pelle) deve essere identica (o essere un suo surrogato plausibile) a quella a cui possono essere esposti gli esseri umani o le altre specie bersaglio potenziali. Il livello o i livelli di dose devono essere scelti conformemente a quanto indicato ai paragrafi da 20 a 26 del presente metodo di prova. I fattori di cui tenere conto nella scelta della o delle dosi da somministrare per via cutanea sono la prevista esposizione umana e/o le dosi alle quali è stata osservata tossicità in altri studi di tossicità cutanea. La o le dosi da somministrare per via cutanea devono essere disciolte in un veicolo idoneo e applicate in congrua quantità. Poco prima della prova si effettua il taglio del pelo nella parte dorsale del corpo degli animali. Si può usare la rasatura, ma questa dovrebbe essere effettuata circa 24 ore prima dell'inizio della prova. Durante le operazioni di taglio o rasatura, si deve badare a non ledere la cute dell'animale per evitarne l'abrasione che potrebbe alterarne la permeabilità. Si dovrà preparare circa il 10 % della superficie corporea per l'applicazione della sostanza in esame. In caso di sostanze altamente tossiche, la superficie può essere inferiore al 10 %, ma deve però essere coperta quanto più possibile da uno strato uniforme e sottile della sostanza. La superficie esposta deve essere la stessa per tutti i gruppi di animali che partecipano alla prova cutanea. Le superfici esposte devono essere protette con una protezione idonea adeguatamente fissata in posizione. Gli animali vanno alloggiati separatamente.

75. È necessario svolgere uno studio sul lavaggio cutaneo per determinare la quantità di dose somministrata che può essere rimossa dalla pelle mediante un lavaggio della superficie esposta con sapone delicato e acqua. Tale studio può essere utilizzato anche per stabilire il bilancio di massa quando la sostanza in esame viene somministrata per via cutanea. Per realizzare questo studio, applicare un dose unica della sostanza su due animali. La scelta del livello della dose va effettuata conformemente a quanto indicato al paragrafo 23 del presente metodo di prova (cfr. anche paragrafo 76 per indicazioni sul tempo di contatto con la pelle). Per valutare l'efficacia della rimozione della sostanza in esame attraverso questo metodo di lavaggio, occorre determinare la quantità di sostanza recuperata nell'acqua di lavaggio.

76. Salvo che la corrosività lo impedisca, una volta applicata, la sostanza chimica in esame va lasciata a contatto della pelle per un minimo di 6 ore. Una volta rimossa la protezione, l'area esposta deve essere lavata seguendo la procedura descritta per lo studio sul lavaggio cutaneo (cfr. paragrafo 75). Analizzare sia la protezione sia l'acqua di lavaggio per determinare la quantità residua della sostanza chimica in esame. Al termine dello studio, gli animali vengono sottoposti a eutanasia, conformemente al riferimento bibliografico (2), e la pelle esposta viene rimossa. Occorre analizzare una sezione idonea della pelle esposta per determinare i residui della sostanza chimica in esame (radioattività).

77. Per la valutazione tossicocinetica dei prodotti farmaceutici può essere necessario ricorrere ad altri protocolli, conformemente agli obblighi normativi applicabili.

▼M4

Via inalatoria

78. Per questo tipo di studi va utilizzata una concentrazione unica (o più concentrazioni, se necessario) della sostanza in esame. La o le concentrazioni devono essere scelte conformemente a quanto indicato ai paragrafi da 20 a 26 del presente metodo di prova. La somministrazione per via inalatoria deve effettuarsi tramite apparecchi che consentono di esporre solo il naso o la testa, in modo da evitare l'assorbimento tramite altre vie d'esposizione (8). Se vengono utilizzate altre condizioni di esposizione per via inalatoria, è necessario giustificare e documentare la scelta. Il periodo di esposizione va indicato (generalmente, si situa tra le 4 e le 6 ore).

BIBLIOGRAFIA

(1) OCSE (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.

(2) OCSE (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N°19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.

(3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73-81.

(4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25-40.

(5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400 – 411.

(6) Capitolo B.45 del presente allegato, Assorbimento cutaneo: metodo in vitro.

(7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-Based-Pharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

(8) OCSE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Capitolo B.44 del presente allegato, Assorbimento cutaneo: metodo in vivo.

(10) Barton HA, *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(11) Gibaldi M and Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Appendice

DEFINIZIONI

Assorbimento: processo o processi tramite i quali una sostanza chimica attraversa i tessuti o vi penetra. L'assorbimento si riferisce a un composto progenitore e a tutti i suoi metaboliti. Non va confuso con «biodisponibilità».

Accumulo (bioaccumulo): aumento, nel corso del tempo, della quantità della sostanza chimica in esame nei tessuti (solitamente tessuti grassi, dopo ripetute esposizioni); se la quantità somministrata della sostanza in esame è maggiore della quantità eliminata, essa si accumula nell'organismo fino anche a raggiungere concentrazioni tossiche.

ADME: sigla che sta per «Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo ed Escrezione».

AUC (*Area Under the Curve*, area sotto la curva): area sotto la curva «concentrazione plasmatica/tempo» della sostanza in esame. Rappresenta il volume totale della sostanza in esame assorbita dal corpo in un intervallo di tempo predeterminato. In condizioni lineari, l'AUC (da zero a infinito) è proporzionale al volume totale della sostanza in esame assorbita dal corpo, a prescindere dal tasso di assorbimento.

Autoradiografia: (autoradiografia a corpo intero) tecnica utilizzata per determinare qualitativamente e/o quantitativamente la localizzazione tissutale della sostanza radioattiva in esame; utilizza pellicola a raggi X o, più recentemente, immagini digitali su schermi al fosforo per visualizzare molecole o frammenti di molecole radiomarcate, registrando l'irraggiamento emesso all'interno dell'oggetto studiato. Rispetto alla dissezione degli organi, l'autoradiografia quantitativa a corpo intero può comportare dei vantaggi per determinare la distribuzione della sostanza in esame e valutare il recupero globale e la risoluzione del materiale radioattivo nei tessuti. Un vantaggio significativo, per esempio, è rappresentato dal fatto che questa tecnica può essere utilizzata su un modello animale pigmentato per valutare l'eventuale associazione della sostanza in esame con la melanina, che può legarsi ad alcune molecole. Tuttavia, sebbene possa rappresentare un mezzo utile per visualizzare globalmente i siti di fissazione di grande capacità e bassa affinità, questa tecnica può rivelarsi meno efficace per quanto riguarda il riconoscimento di siti bersaglio specifici quali i siti di fissaggio dei recettori per rilevare i quali è necessario ricorrere a risoluzioni e sensibilità relativamente elevate. Quando si ricorre all'autoradiografia, gli esperimenti intesi a determinare il bilancio di massa dei composti somministrati vanno svolti su un gruppo distinto o tramite uno studio distinto rispetto a quello che si concentra sulla distribuzione tissutale, nel quale tutti gli escreti (che possono includere l'aria espirata) e le carcasse intere vengono omogeneizzati e testati tramite conteggio in scintillazione liquida.

Escrezione biliare: escrezione attraverso i dotti biliari.

Bioaccumulo: cfr. «accumulo».

Biodisponibilità: frazione di una dose somministrata che raggiunge la circolazione sistemica o viene resa disponibile nel sito dell'attività fisiologica. Generalmente, la biodisponibilità della sostanza in esame si riferisce al composto progenitore, ma potrebbe riferirsi ai suoi metaboliti. Tiene conto di una sola forma chimica. *NB* biodisponibilità e assorbimento non sono sinonimi. La differenza, ad esempio, tra assorbimento orale (cioè presenza nella parete intestinale e circolazione portale) e biodisponibilità (cioè presenza nel sangue sistemico e nei tessuti) potrebbe derivare, tra le varie possibilità, dalla degradazione chimica dovuta al metabolismo delle pareti intestinali, dall'efflusso verso il lume intestinale o dal metabolismo presistemico nel fegato (10). La biodisponibilità del componente tossico (il composto progenitore o un metabolita) rappresenta un parametro fondamentale per la valutazione del rischio per gli esseri umani (estrapolazione da dosi basse a dosi alte, estrapolazione da una via all'altra) per poter derivare un valore interno dal NOAEL o dalla BMD esterni (dose applicata). Per studiare gli effetti sul fegato in caso di somministrazione orale, è sufficiente l'assorbimento orale. Tuttavia, per valutare tutti gli altri effetti, escluso quello alla porta d'entrata, il parametro generalmente più affidabile da utilizzare per un'ulteriore valutazione del rischio è rappresentato dalla biodisponibilità e non dall'assorbimento.

▼M4

Biopersistenza: cfr. «Persistenza».

Biotrasformazione: conversione chimica (solitamente enzimatica), all'interno del corpo, della sostanza in esame in una sostanza chimica diversa. Sinonimo di «metabolismo».

C_{max}: concentrazione massima (picco di concentrazione) nel sangue (plasma/siero) dopo la somministrazione, oppure escrezione massima (picco di escrezione) nelle urine o nelle feci dopo la somministrazione.

Velocità di eliminazione (*clearance rate*): misura quantitativa della velocità alla quale una sostanza viene eliminata dal sangue, dal plasma o da un dato tessuto, per unità di tempo.

Compartimento: porzione (o unità) strutturale o biochimica di un corpo, tessuto o cellula, separata dal resto di tale corpo, tessuto o cellula.

Vie di detossificazione: serie di tappe che conducono all'eliminazione delle sostanze tossiche dal corpo, per trasformazione metabolica o per escrezione.

Distribuzione: dispersione di un prodotto chimico e dei suoi derivati attraverso l'organismo.

Enzimi/Isoenzimi: Proteine che catalizzano le reazioni chimiche. Gli isoenzimi sono enzimi che catalizzano reazioni chimiche simili ma si differenziamo nella sequenza degli aminoacidi.

Parametri enzimatici: K_m (costante di Michaelis) e V_{max} (velocità massima).

Escrezione: processo o processi attraverso i quali una sostanza somministrata e/o i suoi metaboliti vengono rimossi dal corpo.

Esogeno: introdotto dall'esterno o prodotto all'esterno dell'organismo o del sistema.

Estrapolazione: inferenza di uno o più valori sconosciuti sulla base di ciò che è conosciuto o è stato osservato.

Emivita ($t_{1/2}$): tempo necessario a ridurre della metà la concentrazione della sostanza in esame in un comparto. Si riferisce generalmente alla concentrazione del plasma o alla quantità della sostanza presente nell'intero corpo.

Induzione/Induzione enzimatica: sintesi degli enzimi in risposta a uno stimolo ambientale o a una molecola induttrice.

Linearità/cinetica lineare: in cinetica si definisce un processo come lineare quando tutte le velocità di trasferimento tra compartimenti sono proporzionali alle quantità o concentrazioni presenti, cioè di primo ordine. Di conseguenza i volumi di eliminazione e di distribuzione sono costanti, allo stesso modo delle emivite. Le concentrazioni ottenute sono proporzionali ai tassi di somministrazione (esposizione) e l'accumulo è più facilmente prevedibile. È possibile valutare la linearità/non linearità attraverso il confronto dei parametri pertinenti, ad esempio l'AUC, dopo la somministrazione di dosi diverse o dopo un'esposizione singola e un'esposizione ripetuta. L'assenza di dose-dipendenza può essere indicativa della saturazione degli enzimi coinvolti nel metabolismo del composto, un aumento dell'AUC dopo esposizione ripetuta rispetto all'esposizione singola può indicare invece l'inibizione del metabolismo e, infine, una riduzione dell'AUC può indicare l'induzione del metabolismo [cfr. anche (11)].

Bilancio di massa: contabilità delle entrate e delle uscite dal sistema della sostanza chimica in esame.

Bilancio di materia: cfr. «bilancio di massa».

▼M4

Meccanismo (Modalità) di tossicità/d'azione: il meccanismo d'azione si riferisce alle interazioni biochimiche specifiche attraverso le quali una sostanza produce il suo effetto. La modalità d'azione si riferisce ai fenomeni più generali attraverso i quali si manifesta la tossicità di una sostanza.

Metabolismo: sinonimo di «biotrasformazione».

Metaboliti: prodotti del metabolismo o dei processi metabolici.

Assorbimento orale: percentuale della dose di sostanza in esame assorbita a partire dal sito di somministrazione (per esempio: tratto gastrointestinale). Si tratta di un parametro fondamentale che può aiutare a comprendere quale frazione della sostanza somministrata raggiunge la vena porta e in seguito il fegato.

Coefficiente di ripartizione: chiamato anche «coefficiente di distribuzione», misura la solubilità differenziale di una sostanza chimica in due solventi.

Concentrazione sanguinea (plasmatica/sierica) massima: concentrazione massima (picco di concentrazione) nel sangue (plasma/siero) dopo la somministrazione (cfr. anche «C_{max}»).

Persistenza (biopersistenza): presenza a lungo termine di una sostanza chimica (in un sistema biologico) dovuta alla sua resistenza alla degradazione/eliminazione.

Metodo read-across: metodo con il quale le informazioni sull'endpoint di una o più sostanze chimiche vengono utilizzate per prevedere l'endpoint della sostanza in esame.

Autoradiografia microscopica dei recettori (microautoradiografia dei recettori): tecnica che può essere utilizzata per studiare l'interazione xenobiotica con popolazioni di cellule o siti tissutali specifici, per esempio nel quadro degli studi sulla fissazione al recettore o sulla modalità d'azione specifica che possono richiedere una qualità di risoluzione e sensibilità impossibile da ottenere con altre tecniche come l'autoradiografia a corpo intero.

Via di somministrazione (per via orale, endovenosa, cutanea, per inalazione ecc.): come le sostanze chimiche vengono somministrate al corpo (es.: per via orale mediante sonda gastrica o mediante dieta, per via cutanea, per inalazione, per endovena ecc.).

Saturazione: stato nel quale uno o più processi cinetici (es.: assorbimento, metabolismo o eliminazione) raggiungono il picco massimo (sono cioè «saturi»).

Sensibilità: capacità di un metodo o di uno strumento di discriminare tra misurazioni corrispondenti a diversi livelli di risposta alla variabile in causa.

Concentrazione sanguinea (plasmatica) allo stato stazionario: stato di non equilibrio di un sistema aperto nel quale tutte le forze che agiscono sul sistema sono perfettamente controbilanciate da forze opposte in modo tale che tutti i componenti del sistema abbiano una concentrazione stazionaria, nonostante al suo interno circoli della materia.

Modellizzazione dei sistemi (modello tossicocinetico su base fisiologica, modello su base farmacocinetica, modello farmacocinetico su base fisiologica, modello su base biologica ecc.): modello astratto che utilizza il linguaggio matematico per descrivere il comportamento di un sistema.

Tessuto bersaglio: tessuto nel quale si manifesta il principale effetto avverso del tossico.

▼M4

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

Distribuzione tissutale: movimento reversibile di una sostanza chimica da un punto a un altro del corpo. La distribuzione tissutale può essere studiata ricorrendo a dissezione, omogeneizzazione, combustione e conteggio in scintillazione liquida di un organo oppure a autoradiografia qualitativa o quantitativa a corpo intero. Il primo metodo è utile per ottenere la concentrazione e la percentuale di recupero nei tessuti e nella carcassa degli stessi animali, ma può fornire una risoluzione insufficiente per tutti i tessuti e raggiungere un recupero globale che è lungi dall'essere ideale (< 90 %). Cfr. «autoradiografia».

$\mathbf{T_{max}}$: tempo necessario a raggiungere C_{max}.

Tossicocinetica (farmacocinetica): studio dell'assorbimento, della distribuzione, del metabolismo e dell'escrezione delle sostanze chimiche, nel tempo.

Convalida dei modelli: processo destinato a valutare se un modello descriva convenientemente i dati tossicocinetici disponibili. I modelli possono essere valutati attraverso la comparazione statistica o visiva delle loro predizioni con i valori sperimentali, in funzione di una variabile indipendente comune (ad esempio il tempo). La portata della valutazione dev'essere giustificata in funzione dell'uso che si intende fare del modello.

▼B

B.37. NEUROTOSSICITÀ RITARDATA DI SOSTANZE ORGANOFOSFORICHE DOPO ESPOSIZIONE ACUTA

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

Per la valutazione degli effetti tossici delle sostanze è importante tener conto della facoltà di talune classi di sostanze di indurre effetti neurotossici specifici che potrebbero non essere messi in luce da altri studi di tossicità. Alcune sostanze organofosforiche, che hanno evidenziato una neurotossicità ritardata, dovrebbero essere oggetto di una valutazione in questo senso.

Saggi preliminari in vitro consentono di identificare le sostanze suscettibili di indurre una polineuropatia ritardata; tuttavia risultati di studi in vitro non garantiscono l'assenza di neurotossicità della sostanza saggiata.

Vedi introduzione generale, parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Le sostanze organofosforiche comprendono esteri, tioesteri o anidridi organofosforici neutri degli acidi organofosforico, organofosfonico o organofosforamidico o dei corrispondenti acidi fosforotioico, fosfonotioico o fosforotioamidico, o altre sostanze suscettibili di indurre gli effetti neurotossici ritardati talvolta osservati in questa classe di sostanze.

La neurotossicità ritardata è una sindrome associata ad atassia prolungata a comparsa tardiva, ad assonopatie distali del midollo spinale e dei nervi periferici e ad un'inibizione e un invecchiamento dell'esterasi suggestiva di neuropatia (NTE, neuropathy target esterase) nei tessuti nervosi.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Una sostanza di riferimento può essere sagggiata in un gruppo di controllo positivo al fine di dimostrare che, nelle condizioni sperimentali utilizzate, la reazione delle specie esaminate non ha subito variazioni significative.

Una sostanza neurotossica di comune utilizzo è il tri-o-tolil fosfato [CAS 78-30-8, E1NECS 201-103-5, nomenclatura CAS: acido fosforico, tris (2-metilfenil)estere], noto anche come tris-o-cresilfosfato.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

La sostanza in esame viene somministrata per via orale in un'unica dose a galline eventualmente protette contro effetti colinergici acuti. Gli animali vengono tenuti in osservazione per 21 giorni al fine di individuare eventuali anomalie del comportamento, atassia e paralisi. A 24 e 48 ore di distanza dalla somministrazione vengono effettuate analisi biochimiche, e in particolare l'inibizione della NTE, su galline selezionate da ciascun gruppo secondo un criterio di casualità. Ventun giorni dopo l'esposizione si sopprimono gli animali superstiti e si procede all'esame istopatologico di determinati tessuti nervosi.

▼B

1.5. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

1.5.1. **Preparazioni**

Galline adulte, giovani e sane, che non presentino affezioni virali e non siano trattate con farmaci suscettibili di alterare i risultati del saggio, nonché esenti da turbe della deambulazione, vengono assegnate in modo casuale a gruppi da trattare e di controllo e acclimatate alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni prima dell'inizio del saggio.

Le gabbie o i recinti saranno sufficientemente ampi affinché gli animali possano muoversi liberamente ed essere facilmente osservati durante la deambulazione.

Di norma la sostanza in esame viene somministrata per via orale tramite sonda gastrica, capsule di gelatina o un metodo analogo. Le sostanze liquide possono essere somministrate non diluite o disciolte in un veicolo appropriato, quale l'olio di mais. Se possibile, si avrà cura di sciogliere le sostanze solide, in quanto dosi elevate di tali sostanze in capsule di gelatina possono non essere completamente assorbite. Per i veicoli non acquosi, le caratteristiche di tossicità del veicolo dovranno essere note o, in caso contrario, determinate prima del saggio.

1.5.2. **Condizioni sperimentali**

1.5.2.1. *Animali da esperimento*

Si utilizzeranno di preferenza galline domestiche ovaiole (*Gallus gallus domesticus*), giovani e adulte, di età compresa tra 8 e 12 mesi, appartenenti a razze e a ceppi di taglia standard. Gli animali saranno allevati in condizioni che ne garantiscano la libertà di movimento.

1.5.2.2. *Numero e sesso*

Oltre al gruppo da trattare, si utilizzeranno un gruppo di controllo positivo ed uno con somministrazione del solo veicolo. Quest'ultimo sarà trattato in modo identico al primo, tranne per il fatto che agli animali non verrà somministrata la sostanza in esame.

Ogni gruppo dovrà comprendere un numero sufficiente di animali, in modo che almeno sei esemplari possano essere soppressi per effettuare le analisi biochimiche (tre a 24 ore e tre a 48 ore di distanza dalla somministrazione) ed altri sei possano sopravvivere per i 21 giorni del periodo di osservazione.

Il gruppo di controllo positivo può essere attuale o appartenere a studi recentemente effettuati. Esso comprenderà almeno sei animali trattati con una sostanza neurotossica nota ad effetto ritardato, tre dei quali saranno destinati alle analisi biochimiche e tre all'osservazione. È opportuno procedere ad un aggiornamento periodico dei dati storici. Nuovi dati di controllo positivo dovranno essere elaborati ogniqualvolta venga modificato un elemento essenziale del saggio (quale il ceppo, il tipo di alimentazione o le condizioni di alloggiamento degli animali).

▼B

1.5.2.3. *Livelli di dosaggio*

Per la determinazione del livello di dosaggio da utilizzare nello studio principale si procederà ad uno studio preliminare su un numero adeguato di animali suddivisi in gruppi trattati con diversi livelli di dosaggio. Per una corretta definizione di detto parametro sono generalmente necessari in questa fase preliminare, un certo numero di decessi. Tuttavia, al fine di evitare decessi cagionati da effetti colinergici acuti, si potrà fare ricorso ad atropina o ad un altro agente protettivo che non sia suscettibile di interferire con eventuali reazioni neurotossiche ritardate. Esistono diversi metodi per la determinazione della dose massima non letale di una sostanza (vedi metodo B.l *bis*). Anche i dati di precedenti studi su galline o altre informazioni tossicologiche possono essere utili a questo scopo.

Il livello di dosaggio da utilizzare nello studio principale deve essere il più elevato possibile tenendo conto dei risultati ottenuti nello studio preliminare per la determinazione del dosaggio e del limite massimo di 2 000 mg/kg peso corporeo. Indipendentemente dal tasso di mortalità, è indispensabile che un numero sufficiente di animali sopravviva per l'esecuzione delle analisi biochimiche (sei) e dell'esame istologico del ventunesimo giorno (sei). Per evitare decessi cagionati da effetti colinergici acuti, si potranno somministrare atropina o un analogo agente protettivo che non sia suscettibile di interferire con eventuali reazioni neurotossiche ritardate.

1.5.2.4. *Saggio limite*

Qualora un saggio, effettuato in conformità con il metodo descritto, con un livello di dosaggio di almeno 2 000 mg/kg di peso corporeo/giorno, non produca effetti tossici evidenti e se i dati relativi a sostanze di struttura affine non sono suggestivi di tossicità, può non essere necessario somministrare un dosaggio superiore. Il saggio limite è giustificato, salvo nel caso in cui l'esposizione umana comporti la necessità di utilizzare un più elevato livello di dosaggio.

1.5.2.5. **Periodo di osservazione**

Il periodo di osservazione avrà una durata di 21 giorni.

1.5.3. **Procedimento**

Dopo aver trattato gli animali con un agente protettivo atto a prevenire effetti colinergici acuti potenzialmente letali, si somministra la sostanza in esame in una singola dose.

1.5.3.1. Osservazioni generali

II periodo di osservazione inizia subito dopo l'esposizione alla sostanza. Tutte le galline saranno accuratamente esaminate diverse volte per i primi 2 giorni e almeno quotidianamente a partire dal terzo fino alla soppressione degli animali, prevista per il ventunesimo giorno. Si registreranno tutti i segni di tossicità, nonché il momento della comparsa, la natura, la gravità e la durata di qualsiasi anomalia del comportamento. Per l'atassia si utilizzerà un sistema di classificazione comprendente un minimo di quatro livelli; si registreranno altresì i casi di paralisi. Almeno due volte alla settimana le galline selezionate per l'osservazione dovranno essere tolte dalle gabbie o sottoposte ad attività motoria forzata (ad esempio salire le scale) al fine di agevolare l'osservazione degli effetti tossici minimi. Gli animali moribondi o recanti segni gravi e persistenti di sofferenza dovranno essere immediatamente sottoposti ad eutanasia e ad esame necroscopico.

▼B

1.5.3.2. Peso corporeo

Tutte le galline saranno pesate poco prima della somministrazione della sostanza e almeno una volta alla settimana successivamente.

1.5.3.3. Biochimica

Pochi giorni dopo l'esposizione si sopprimeranno sei galline scelte in modo casuale da ciascuno dei gruppi trattati e di controllo negativo e tre appartenenti al gruppo di controllo positivo (se realizzato). Il cervello e il midollo spinale lombare saranno quindi preparati e analizzati per identificare un'eventuale attività di inibizione della NTE. Inoltre può essere utile effettuare la stessa analisi su tessuti del nervo sciatico. Generalmente si sopprimono tre animali per il gruppo di controllo e per ciascuno dei gruppi trattati a distanza di 24 ore ed altri tre a distanza di 48 ore, mentre le tre galline del gruppo di controllo positivo vengono soppresse dopo 24 ore. Qualora l'osservazione dei segni clinici di intossicazione (spesso valutabili in funzione della comparsa di effetti colinergici) suggerisca che l'eliminazione della sostanza tossica avviene molto lentamente, può essere preferibile effettuare altri due prelievi tissutali da tre animali nel periodo compreso tra 24 e non oltre 72 ore dopo la somministrazione.

Se del caso, è possibile effettuare su tali tessuti analisi dell'acetilcolinesterasi (AChE). Tuttavia si può avere una riattivazione spontanea dell'AChE *in vivo*, il che potrebbe indurre a sottovalutare il potenziale di inibizione dell'AChE di una sostanza.

1.5.3.4. Necroscopia macroscopica

L'esame necroscopico di tutti gli animali (sia di quelli soppressi come da programma che di quelli sottoposti ad eutanasia) dovrà comprendere l'osservazione dell'aspetto del cervello e del midollo spinale.

1.5.3.5. Esame istopatologico

I tessuti nervosi degli animali sopravvissuti al periodo di osservazione e non utilizzati per gli studi biochimici saranno sottoposti ad esame microscopico. Essi saranno fissati in situ con tecniche di perfusione. I prelievi tissutali saranno effettuati su cervelietto (piano longitudinale medio), midollo allungato, midollo spinale e nervi periferici. Il midollo spinale sarà prelevato dal tratto cervicale superiore, dal terzo toracico centrale e dal tratto lombosacrale. Si preleveranno inoltre tessuti dal segmento distale del nervo tibiale e delle sue ramificazioni verso il muscolo gastrocnemio e dal nervo sciatico. I tessuti saranno colorati con appositi coloranti specifici per la mielina e gli assoni.

2. **DATI**

Di norma, se i risultati ottenuti per i parametri di valutazione adottati nel presente metodo (biochimica, istopatologia e osservazione del comportamento) sono negativi, non è necessario eseguire ulteriori saggi di neurotossicità ritardata. Risultati equivoci o non conclusivi possono invece richiedere un approfondimento.

Dovranno essere forniti i dati individuali di ciascun animale. Inoltre, tutti i dati dovranno essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo, il numero di animali all'inizio del saggio, il numero di animali recanti lesioni, alterazioni del comportamento o effetti biochimici, la natura e la gravità di detti effetti o lesioni e la percentuale di animali per ogni tipo di effetto o lesione e per ogni livello di gravità.

▼B

I risultati del presente studio dovranno essere valutati in termini di incidenza, gravità e correlazione tra effetti comportamentali, biochimici e istopatologici e qualsiasi altro effetto osservato nei gruppi trattati e di controllo.

I risultati numerici dovranno essere elaborati sulla base di metodi statistici appropriati e generalmente riconosciuti. I metodi statistici saranno selezionati durante la fase di progettazione dello studio.

3. **RELAZIONE**

RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione sul saggio deve, se possibile, includere le seguenti informazioni.

Animali da esperimento:

— ceppo utilizzato,

— numero e età degli animali,

— origine, condizioni di allogiamento, ecc.,

— peso di ciascun animale all'inizio del saggio.

Condizioni sperimentali:

— modalità precise di preparazione della sostanza in esame, stabilità e omogeneità, ove del caso,

— motivazione della scelta del veicolo,

— modalità precise di somministrazione della sostanza in esame,

— caratteristiche della qualità del cibo e dell'acqua,

— motivazione della scelta del dosaggio,

— dosi somministrate, caratteristiche del veicolo, volume e forma fisica della sostanza somministrata,

— tipo di agente protettivo e caratteristiche di somministrazione, ove del caso.

Risultati:

— dati relativi al peso corporeo,

— dati relativi alla reazione tossica per ciascun gruppo, compresa la mortalità,

— natura, gravità e durata degli effetti clinici osservati (ed eventuale reversibilità),

— descrizione particolareggiata delle analisi biochimiche e relativi risultati,

— risultati dell'esame necroscopico,

— descrizione particolareggiata di tutti i reperti istopatologici,

— elaborazione statistica dei risultati, ove del caso.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **RIFERIMENTI**

Il presente metodo corrisponde al metodo OCSE TG 418.

▼B

B.38. NEUROTOSSICITÀ RITARDATA DI SOSTANZE ORGANOFOSFORICHE STUDIO CON SOMMINISTRAZIONE RIPETUTA PER 28 GIORNI

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

Per la valutazione degli effetti tossici delle sostanze è importante tener conto della facoltà di talune classi di sostanze di indurre effetti neurotossici specifici che potrebbero non essere messi in luce da altri studi di tossicità. Alcune sostanze organofosforiche, che hanno evidenziato una neurotossicità ritardata, dovrebbero essere oggetto di una valutazione in questo senso.

Saggi preliminari in vitro consentono di identificare le sostanze suscettibili di indurre una polineuropatia ritardata; tuttavia risultati negativi di studi in vitro non garantiscono l'assenza di neurotossicità della sostanza saggiata.

Il presente saggio di neurotossicità ritardata su 28 giorni fornisce informazioni sui rischi che l'esposizione ripetuta per un periodo limitato di tempo può comportare per la salute. Esso consente di trarre indicazioni sulla correlazione dose-risposta e di valutare il NOAEL applicabile per la determinazione di criteri di sicurezza per l'esposizione.

Vedi anche introduzione generale, parte B.

1.2. DEFINIZIONI

Le sostanze organofosforiche comprendono esteri, tioesteri o anidridi organofosforici neutri degli acidi organofosforico, organofosfonico o organofosforamidico o dei corrispondenti acidi fosforotioico, fosfonotioico o fosforotioamidico, o altre sostanze suscettibili di indurre gli effetti neurotossici ritardati talvolta osservati in questa classe di sostanze.

La neurolossicità ritardata è una sindrome associata ad atassia prolungata a comparsa tardiva, ad assonopatie distali del midollo spinale e dei nervi periferici e ad un'inibizione e un invecchiamento dell'esterasi suggestiva di neuropatia (NTE, neuropathy target esterase) nei tessuti nervosi.

1.3. PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

La sostanza in esame viene quotidianamente somministrata per via orale a galline domestiche per un periodo di 28 giorni. Gli animali vengono esaminati almeno una volta al giorno al fine di individuare eventuali anomalie del comportamento, atassia e paralisi fino a 14 giorni dopo l'ultima somministrazione. Analisi biochimiche, e in particolare l'inibizione della NTE, vengono di norma eseguite 24 e 48 ore dopo l'ultima esposizione su galline selezionate da ciascun gruppo secondo un criterio di casualità. Due settimane dopo l'ultima somministrazione si sopprimono gli animali superstiti e si procede all'esame istopatologico di determinati tessuti nervosi.

▼B

1.4. DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

1.4.1. **Preparazioni**

Galline adulte, giovani e sane, che non presentino affezioni virali e non siano trattate con farmaci suscettibili di alterare i risultati del saggio, nonché esenti da turbe della deambulazione, vengono assegnate in modo casuale a gruppi da trattare e di controllo e acclimatate alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni prima dell'inizio del saggio.

La gabbie o i recinti saranno sufficientemente ampi affinché gli animali possano muoversi liberamente ed essere facilmente osservati durante la deambulazione.

La sostanza viene somministrata giornalmente, sette giorni su sette, preferibilmente tramite sonda gastrica o capsule di gelatina. Le sostanze liquide possono essere somministrate non diluite o disciolte in un veicolo appropriato, quale l'olio di mais. Se possibile, si avrà cura di sciogliere le sostanze solide, in quanto dosi elevate di tali sostanze in capsule di gelatina possono non essere completamente assorbite. Per i veicoli non acquosi, le caratteristiche di tossicità del veicolo dovranno essere note o, in caso contrario, determinate prima del saggio.

1.4.2. **Condizioni sperimentali**

1.4.2.1. *Animali da esperimento*

Si utilizzeranno di preferenza galline domestiche ovaiole (*Gallus gallus domesticus*), giovani e adulte, di età compresa tra 8 e 12 mesi, appartenenti a razze e a ceppi di taglia standard. Gli animali saranno allevati in condizioni che ne garantiscano la libertà di movimento.

1.4.2.2. *Numero e sesso*

Si utilizzano di norma almeno tre gruppi da trattare ed uno di controllo con somministrazione del solo veicolo. Quest'ultimo sarà trattato in modo identico ai primi, tranne per il fatto che agli animali non verrà somministrata la sostanza in esame.

Ogni gruppo dovrà comprendere un numero sufficiente di animali, in modo che almeno sei esemplari possano essere soppressi per effettuare le analisi biochimiche (tre a 24 e tre a 48 ore di distanza dall'ultima somministrazione) ed altri sei possano sopravvivere per i 14 giorni del periodo di osservazione.

1.4.2.3. *Livelli di dosaggio*

I livelli di dosaggio dovranno essere selezionati tenendo conto dei risultati del saggio di neurotossicità ritardata dopo esposizione acuta e di tutti i dati di tossicità o di tossicocinetica esistenti per la sostanza in esame. Il livello massimo di dosaggio dovrà essere tale da indurre effetti tossici, preferibilmente effetti neurotossici ritardati, senza tuttavia cagionare la morte o sofferenze gravi. Sarà inoltre definita una serie descrescente di dosaggi al fine di individuare eventuali risposte a dosi determinate e dimostrare l'assenza di effetti avversi al dosaggio minimo.

▼B

1.4.2.4. *Saggio limite*

Qualora un saggio, effettuato in conformità con il metodo descritto, con un livello di dosaggio di almeno 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno, non produca effetti tossici evidenti e se i dati relativi a sostanze di struttura affine non sono suggestivi di tossicità, può non essere necessario somministrare un dosaggio superiore. Il saggio limite giustificato, salvo nel caso in cui l'esposizione umana comporti la necessità di utilizzare un più elevato livello di dosaggio.

1.4.2.5. *Periodo di osservazione*

Tutti gli animali saranno esaminati almeno quotidianamente durante il periodo di esposizione e nei 14 giorni successivi, salvo nel caso in cui sia previsto un esame necroscopico.

1.4.3. **Procedimento**

La sostanza in esame viene somministrata sette giorni su sette per un periodo di 28 giorni.

1.4.3.1. *Osservazioni generali*

Il periodo di osservazione inizia subito dopo l'esposizione alla sostanza. Tutte le galline saranno accuratamente esaminate almeno una volta al giorno per i 28 giorni del trattamento e i 14 giorni successivi, fino al momento della loro soppressione. Si registreranno futi i segni di tossicità, specificandone il momento della comparsa, la natura, la gravità e la durata. Le osservazioni riguarderanno, tra l'altro, eventuali anomalie comportamentali. Per l'atassia si utilizzerà un sistema di classificazione comprendente un minimo di quattro livelli; si registreranno altresì i casi di paralisi. Almeno due volte alla settimana le galline selezionate per l'osservazione dovranno essere tolte dalle gabbie e sottoposte ad attività motoria forzata (ad esempio salire le scale) al fine di agevolare l'osservazione degli effetti tossici minimi. Gli animali moribondi o recanti segni gravi e persistenti di sofferenza dovranno essere immediatamente sottoposti ad eutanasia e ad esame necroscopico.

1.4.3.2. *Peso corporeo*

Tutte le galline saranno pesate poco prima della somministrazione della sostanza e almeno una volta alla settimana successivamente.

1.4.3.3. *Biochimica*

Pochi giorni dopo l'ultima esposizione si sopprimeranno sei galline scelte in modo casuale da ciascuno dei gruppi trattati e dal gruppo di controllo con somministrazione del solo veicolo. Il cervello e il midollo spinale lombare saranno quindi preparati e analizzati per identificare un'eventuale attività di inibizione della NTE. Inoltre può essere utile effettuare la stessa analisi su tessuti del nervo sciatico. Generalmente si sopprimono tre animali per il gruppo di controllo e per ciascuno dei gruppi trattati dopo 24 ore ed altri tre dopo 48 ore dall'ultima somministrazione. Qualora ciò risulti preferibile in base ai risultati dello studio con esposizione acuta o di altri studi (ad esempio di tossicocinetica), si potranno modificare i tempi previsti per la soppresisone degli animali. Tale scelta dovrà essere tuttavia scientificamente motivata.

Se del caso, è possibile effettuare su tali tessuti analisi dell'acetilcolinesterasi (AChE). Tuttavia si può avere una riattivazione spontanea dell'AChE *in vivo*, il che potrebbe indurre a sottovalutare il potenziale di inibizione dell'AChE di una sostanza.

▼B

1.4.3.4. *Necroscopia macroscopica*

L'esame necroscopico di tutti gli animali (sia di quelli soppressi come da programma che di quelli sottoposti ad eutanasia) dovrà comprendere l'osservazione dell'aspetto del cervello e del midollo spinale.

1.4.3.5. *Esame istopatologico*

I tessuti nervosi degli animali sopravvissuti al periodo di osservazione e non utilizzati per gli studi biochimici saranno sottoposti ad esame microscopico. Essi saranno fissati in situ con tecniche di perfusione. I prelievi tissutali saranno effettuati su cervelletto (piano longitudinale medio), midollo allungato, midollo spinale e nervi periferici. Il midollo spinale sarà prelevato dal tratto cervicale superiore, dal terzo toracico centrale e dal tratto lombosacrale. Si preleveranno inoltre tessuti dal segmento distale del nervo tibiale e delle sue ramificazioni verso il muscolo gastrocnemio e dal nervo sciatico. I tessuti saranno colorati con apposti coloranti specifici per la mielina e gli assoni. L'esame microscopico sarà dapprima effettuato su tessuti conservati di tutti gli animali del gruppo di controllo e di quello trattato con il livello massimo di dosaggio. Qualora in questo gruppo si riscontrino effetti, si procederà all'esame microscopico di tessuti prelevati da animali appartenenti agli altri due gruppi (rispettivamente con somministrazione del dosaggio intermedio e del dosaggio minimo).

2. **DATI**

Di norma, se i risultati ottenuti per i parametri di valutazione adottati nel presente metodo (biochimica, istopatologia e osservazione del comportamento) sono negativi, non è necessario eseguire ulteriori saggi di neurotossicità ritardata. Risultati equivoci o non conclusivi possono invece richiedere un approfondimento.

Dovranno essere forniti i dati individuali di ciascun animale. Inoltre, tutti i dati dovranno essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo, il numero di animali all'inizio del saggio, il numero di animali recanti lesioni, alterazioni del comportamento o effetti biochimici, la natura e la gravita di detti effetti o lesioni e la percentuale di animali per ogni tipo di effetto o lesione e per ogni livello di gravità.

I risultati del presente studio dovranno essere valutati in termini di incidenza, gravità e correlazione tra effetti comportamentali, biochimici e istopatologici e qualsiasi altro effetto osservato nei gruppi trattati e di controllo.

I risultati numerici dovranno essere elaborati sulla base di metodi statistici appropriati e generalmente riconosciuti. I metodi statistici saranno selezionati durante la fase di progettazione dello studio.

3. **RELAZIONE**

RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione sul saggio deve, se possibile, includere le seguenti informazioni.

Animali da esperimento:

— ceppo utilizzato,

— numero e età degli animali,

— origine, condizioni di alloggiamento, ecc.,

— peso di ciascun animale all'inizio del saggio.

▼B

Condizioni sperimentali:

— modalità precise di preparazione della sostanza in esame, stabilità e omogeneità, ove del caso,

— motivazione della scelta del veicolo,

— modalità precise di somministrazione della sostanza in esame,

— caratteristiche della qualità del cibo e dell'acqua,

— motivazione della scelta del dosaggio,

— dosi somministrate, caratteristiche del veicolo, volume e forma fisica della sostanza somministrata,

— qualora le analisi biochimiche vengano effettuate in tempi diversi da quelli previsti (24 e 48 h), motivazione di tale scelta.

Risultati:

— dati relativi al peso corporeo,

— dati relativi alla reazione tossica per ciascun livello di dosaggio, compresa la mortalità,

— livello di esposizione massimo per il quale non siano stati osservati effetti avversi (NOAEL),

— natura, gravità e durata degli effetti clinici osservati (ed eventuale reversibilità),

— descrizione particolareggiata delle analisi biochimiche e relativi risultati,

— risultati dell'esame necroscopico,

— descrizione particolareggiata di tutti i reperti istopatologici,

— elaborazione statistica dei risultati, ove del caso.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **RIFERIMENTI**

Il presente metodo corrisponde al metodo OCSE TG 419.

▼B

B.39. **TEST *IN VIVO* DI SINTESI NON PROGRAMMATA DI DNA (UDS) SU CELLULE EPATICHE DI MAMMIFERO**

▼M9

Questo metodo di prova è stato soppresso in quanto non è più riconosciuto come idoneo per acquisire informazioni sulle proprietà tossicologiche delle sostanze chimiche ai fini del regolamento (CE) n. 1907/2006. I metodi di prova applicabili per l'endpoint in questione figurano nella tabella 2 della parte 0.

▼M8

B.40. CORROSIONE CUTANEA IN VITRO: METODO DI PROVA DELLA RESISTENZA ELETTRICA TRANSCUTANEA (TER)

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 430 (2015). Per corrosione cutanea si intende la manifestazione di lesioni irreversibili della pelle in forma di necrosi visibile dell'epidermide e del derma, a seguito dell'applicazione della sostanza chimica in esame [secondo la definizione del Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (UN GHS) (1) e 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 (CLP) ([1])]. Il presente metodo di prova B.40 aggiornato propone una procedura *in vitro* che consente di individuare le sostanze e le miscele non corrosive e corrosive conformemente al GHS dell'ONU (1) e al regolamento CLP.

2. Tradizionalmente, la valutazione della corrosività cutanea è effettuata su animali da esperimento (TM B.4 equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 404 originariamente adottata nel 1981 e rivista nel 1992, nel 2002 e nel 2015) (2). Oltre al presente metodo di prova B.40 sono stati validati e adottati altri metodi di prova *in vitro* per determinare la corrosività cutanea potenziale di sostanze chimiche, come ad esempio il metodo di prova B.40 *bis* (equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 431) (3) e il metodo di prova B.65 (equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 435) (4), anch'essi in grado di individuare sottocategorie di sostanze chimiche corrosive laddove richiesto. Diversi metodi di prova *in vitro* validati sono stati adottati, ad esempio il metodo di prova B.46 [equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 439 (5)], al fine di essere utilizzati per determinare l'irritazione cutanea. Un documento di orientamento dell'OCSE relativo agli approcci integrati in materia di prove e valutazioni (IATA – *Integrated Approaches to Testing and Assessment*) per la corrosione e l'irritazione cutanea descrive diversi moduli che raggruppano una serie di fonti di informazione e strumenti di analisi e i) fornisce orientamenti su come integrare e utilizzare i dati sperimentali e non sperimentali esistenti per valutare il potenziale di irritazione cutanea e di corrosione cutanea delle sostanze chimiche e ii) propone un approccio quando occorrono prove ulteriori (6).

3. Il presente metodo di prova riguarda l'endpoint per la salute umana della corrosione cutanea. Esso si fonda sul metodo di prova della resistenza elettrica transcutanea (TER) condotto su pelle di ratto che utilizza dischi di tessuto cutaneo per individuare le sostanze corrosive grazie alla loro capacità di produrre una perdita dell'integrità dello strato corneo normale e della funzione di barriera. La linea guida dell'OCSE corrispondente è stata inizialmente adottata nel 2004 e aggiornata nel 2015 per fare riferimento al documento di orientamento IATA.

4. Per valutare le prove di corrosione cutanea *in vitro* a fini regolamentari sono stati condotti studi di prevalidazione (7), seguiti da uno studio di validazione formale del metodo di prova della TER su pelle di ratto per valutare la corrosione cutanea (8) (9) (10) (11). I risultati di questi studi hanno permesso di stabilire che il metodo di prova della TER (denominato metodo di

([1]) 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 (GU L 353 del 31.12.2008, pag. 1).

▼M8

riferimento validato o VRM) può essere utilizzato a fini regolamentari per valutare la corrosività cutanea *in vivo* (12) (13) (14).

5. Prima di poter utilizzare a fini regolamentari un metodo di prova della TER *in vitro* per la corrosione cutanea, simile o modificato, diverso dal VRM, occorre determinarne l'affidabilità, la pertinenza (accuratezza) e i limiti per l'uso proposto al fine di assicurare che sia simile al VRM, conformemente ai requisiti degli standard di prestazione (15). Il quadro del sistema dell'OCSE di reciproca accettazione dei dati sarà garantito solo una volta che i metodi di prova proposti, nuovi o aggiornati, conformi agli standard di prestazione sono stati esaminati e integrati nella corrispondente linea guida dell'OCSE.

DEFINIZIONI

6. Le definizioni usate sono riportate nell'appendice.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

7. I risultati di uno studio di validazione (10) e di altri studi pubblicati (16) (17) indicano che il metodo di prova della TER condotto su pelle di ratto permette di distinguere, tra le sostanze conosciute, quelle che sono corrosive e non corrosive per la pelle con una sensibilità complessiva del 94 % (51/54) e una specificità del 71 % (48/68) in una banca dati di 122 sostanze.

8. Il presente metodo di prova riguarda la corrosione cutanea *in vitro*. Esso permette di individuare le sostanze chimiche non corrosive e corrosive in esame in conformità al GHS delle Nazioni Unite e al regolamento CLP. Un limite del presente metodo di prova, dimostrato dagli studi di validazione (8) (9) (10) (11), è che non permette la sottocategorizzazione delle sostanze e delle miscele corrosive conformemente al GHS delle Nazioni Unite e al regolamento CLP. Il quadro normativo applicabile stabilirà in che modo il presente metodo di prova sarà utilizzato. Se da un lato il presente metodo di prova non fornisce informazioni adeguate sull'irritazione cutanea, è opportuno notare che il metodo B.46 riguarda in modo specifico le prove d'irritazione cutanea *in vitro* e gli effetti sulla salute (5). Per una valutazione completa degli effetti cutanei locali dopo una singola esposizione della pelle, si raccomanda di consultare il documento di orientamento dell'OCSE relativo agli IATA (6).

9. Nella validazione del metodo in questione è stata sottoposta a prova un'ampia gamma di prodotti chimici, rappresentanti principalmente sostanze, e la banca dati empirica dello studio di validazione contava 60 sostanze appartenenti a una vasta gamma di classi di sostanze chimiche (9). I dati generali disponibili indicano che il metodo di prova è applicabile a un'ampia gamma di classi di sostanze chimiche e stati fisici, inclusi liquidi, semisolidi, solidi e cere. Tuttavia, poiché per specifici stati fisici non sono facilmente disponibili sostanze in esame con dati di riferimento adeguati, va notato che durante la validazione è stato valutato un numero relativamente ridotto di cere e solidi corrosivi. I liquidi possono essere acquosi o non acquosi, i solidi possono essere solubili o insolubili in acqua. Il metodo di prova non deve essere utilizzato con una categoria specifica di sostanze qualora possa essere dimostrata la sua non applicabilità a tale categoria specifica. Inoltre, si presume che il metodo di prova sia applicabile alle miscele oltre che alle sostanze. Tuttavia, poiché le miscele coprono un ampio spettro di categorie e composizioni e tenuto conto delle informazioni limitate attualmente disponibili circa la sperimentazione sulle miscele, nei casi in cui sia possibile dimostrare che il metodo di prova non è applicabile a una categoria specifica di miscele (ad esempio applicando una strategia come proposto da Eskes *et al.*, 2012) (18) è opportuno evitare di utilizzare il metodo di prova per tale categoria specifica di sostanze. Prima di applicare il presente metodo di prova a una miscela per generare dati ai fini regolamentari previsti, si deve considerare se, e in caso affermativo perché, esso possa fornire risultati adeguati a tale scopo. Tali considerazioni non sono necessarie laddove esista una disposizione normativa che obblighi a sottoporre a prova la miscela. I gas e gli

▼M8

aerosol non sono ancora stati valutati nell'ambito di studi di validazione (8) (9). Benché sia ipotizzabile che essi possano essere testati utilizzando il metodo di prova della TER, l'attuale metodo di prova non prevede l'esecuzione di prove per gas e aerosol.

PRINCIPIO DELLA PROVA

10. La sostanza chimica in esame è applicata per non più di 24 ore sulla superficie epidermica di dischi di tessuto cutaneo in un sistema di test a due compartimenti nel quale i dischi di tessuto cutaneo fungono da separatori tra i compartimenti. I dischi di tessuto cutaneo sono prelevati da ratti di 28-30 giorni, soppressi con metodi non cruenti. Le sostanze chimiche corrosive sono individuate in base alla loro capacità di comportare una perdita dell'integrità dello strato corneo normale e della funzione di barriera, che si misura come riduzione della TER al di sotto di un livello soglia (16) (cfr. il paragrafo 32). Per la TER su pelle di ratto, un valore limite di 5 kΩ è stato scelto sulla base di molti dati relativi ad un elevato numero di sostanze per le quali la maggior parte dei valori era nettamente superiore (spesso > 10 kΩ), o nettamente inferiore (spesso < 3 kΩ) a tale valore (16). In generale, le sostanze chimiche in esame che sono non corrosive per gli animali ma che sono irritanti o non irritanti non comportano una riduzione della TER al di sotto di tale valore limite. Inoltre, l'utilizzo di altre preparazioni cutanee o di altre attrezzature può alterare il valore limite, rendendo necessaria in tal caso una validazione supplementare.

11. La procedura sperimentale include una sequenza relativa alla fissazione del colorante al fine di confermare i risultati positivi del TER con valori attorno a 5 kΩ. Tale sequenza determina se l'aumento della permeabilità ionica è dovuto alla distruzione fisica dello strato corneo. È stato dimostrato che il metodo della TER su pelle di ratto permetteva di predire la corrosività *in vivo* nel coniglio valutata con il metodo di prova B.4 (2).

DIMOSTRAZIONE DELLA COMPETENZA DI LABORATORIO

12. Prima di utilizzare sistematicamente il metodo di prova della TER su pelle di ratto conforme al presente metodo di prova, i laboratori dimostrano la loro competenza tecnica classificando correttamente le dodici sostanze chimiche per la verifica della competenza tecnica raccomandate nella tabella 1. Nel caso in cui una sostanza in elenco non sia disponibile o nel caso in cui sia giustificato, può essere utilizzata un'altra sostanza per la quale sono disponibili dati di riferimento *in vivo* e *in vitro* (ad esempio scegliendo dalla lista delle sostanze chimiche di riferimento (16)) a condizione che siano applicati i medesimi criteri di selezione di cui alla tabella 1.

Tabella 1

elenco delle sostanze di prova a fini di competenza ([1])

Sostanza	n. CAS	Classe chimica ([2])	Cat. UN GHS/CLP sulla base dei risultati *in vivo* ([3])	Cat. VRM sulla base dei risultati in vitro	Stato fisico	pH ([4])
Sostanze corrosive *in vivo*						
N,N'-dimetil dipropilenetriamina	10563-29-8	base organica	1A	6 × C	L	8,3
1,2-diaminopropano	78-90-0	base organica	1A	6 × C	L	8,3

▼**M8**

Sostanza	n. CAS	Classe chimica ([2])	Cat. UN GHS/CLP sulla base dei risultati *in vivo* ([3])	Cat. VRM sulla base dei risultati in vitro	Stato fisico	pH ([4])
Sostanze corrosive *in vivo*						
acido solforico (10 %)	7664-93-9	acido inorganico	(1A/)1B/1C	5 × C 1 × NC	L	1,2
idrossido di potassio (10 % acq.)	1310-58-3	base inorganica	(1A/)1B/1C	6 × C	L	13,2
acido ottanoico (caprilico)	124-07-2	acido organico	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,6
2-terzbutilfenolo	88-18-6	fenolo	1B/1C	4 × C 2 × NC	L	3,9
Sostanze non corrosive *in vivo*						
acido isostearico	2724-58-5	acido organico	NC	6 × NC	L	3,6
4-amino-1,2,4-triazolo	584-13-4	base organica	NC	6 × NC	S	5,5
fenetil bromuro	103-63-9	elettrofilo	NC	6 × NC	L	3,6
4-(metiltio)-benzaldeide	3446-89-7	elettrofilo	NC	6 × NC	L	6,8
1,9-decadiene	1647-16-1	sostanza organica neutra	NC	6 × NC	L	3,9
tetracloroetilene	127-18-4	sostanza organica neutra	NC	6 × NC	L	4,5

Abbreviazioni: acq. = acquoso; n. CAS = numero di registrazione CAS (*Chemical Abstracts Service Registry Number*); VRM = metodo di riferimento validato; C = corrosivo; NC = non corrosivo.

([1]) Le sostanze di prova a fini di competenza, classificate dapprima come corrosive o non corrosive, poi per sottocategoria di sostanze corrosive e poi per classe chimica, sono state selezionate tra le sostanze utilizzate nello studio di validazione dell'ECVAM per il metodo di prova della TER su pelle di ratto (8) (9). Salvo indicazione contraria, le sostanze sono state sottoposte a prova al livello di purezza ottenuto per le sostanze provenienti dal mercato (8). Nella misura del possibile, nella selezione sono state incluse sostanze che: i) sono rappresentative dello spettro di reazioni di corrosività (ad esempio non corrosive, da poco a fortemente corrosive) che il VRM può misurare o prevedere; ii) sono rappresentative delle classi chimiche usate nello studio di validazione; iii) rispecchiano le caratteristiche di esecuzione del VRM; iv) hanno strutture chimiche ben definite; v) permettono di ottenere risultati definitivi con il metodo di prova di riferimento *in vivo*; vi) sono disponibili sul mercato; e vii) non comportano costi di smaltimento proibitivi.

([2]) Classe chimica assegnata da Barratt *et al.* (8).

([3]) I gruppi di imballaggio delle Nazioni Unite I, II e III corrispondono rispettivamente alle categorie 1A, 1B e 1C del GHS delle Nazioni Unite/regolamento CLP.

([4]) I valori del pH sono stati ottenuti da Fentem *et al.* (9) e da Barratt *et al.* (8).

▼M8

PROCEDURA

13. Esistono procedure operative standard per il metodo di prova della TER su pelle di ratto per valutare la corrosione cutanea (19). I metodi di prova della TER su pelle di ratto che rientrano in tale metodo di prova sono conformi alle seguenti condizioni:

Animali

14. È opportuno l'utilizzo di ratti in quanto la sensibilità della loro pelle alle sostanze utilizzate in questo metodo di prova è stata già dimostrata (12) e si tratta dell'unica fonte di pelle formalmente validata (8) (9). L'età (al momento in cui la pelle è prelevata) e il ceppo del ratto sono particolarmente importanti perché si deve essere sicuri che i follicoli piliferi siano in fase d'inattività, prima dell'inizio della crescita dei peli adulti.

15. I peli della zona dorsale e laterale di giovani ratti maschi o femmine di circa 22 giorni (Wistar o ceppo comparabile) sono rimossi con cura per mezzo di piccole forbici. Gli animali sono successivamente lavati con cura mediante pezze bagnate e la zona rimossa è immersa in una soluzione antibiotica (contenente, ad esempio, streptomicina, penicillina, cloramfenicolo e amfotericina a concentrazioni efficaci per inibire la crescita batterica). Gli animali sono nuovamente lavati con antibiotici il terzo o il quarto giorno dopo il primo lavaggio e sottoposti al test entro 3 giorni dal secondo lavaggio, quando lo strato corneo si è rimesso dalla rimozione dei peli.

Preparazione dei dischi di tessuto cutaneo

16. Gli animali sono soppressi in modo non cruento quando hanno 28-30 giorni (l'età riveste un'importanza particolare). La pelle dorso-laterale di ciascun animale è successivamente rimossa ed accuratamente liberata da qualsiasi eccesso di grasso sottocutaneo. Vengono rimossi dischi di tessuto cutaneo del diametro di circa 20 mm. Il tessuto cutaneo potrà essere conservato prima dell'utilizzo dei dischi se i dati dei controlli positivi e negativi risultano equivalenti a quelli ottenuti sul tessuto cutaneo fresco.

17. Ciascun disco di tessuto cutaneo è posto su una delle estremità di un tubo di politetrafluoroetilene (PTFE), con la superficie epidermica a contatto con il tubo. Dopo aver fissato il disco all'estremità del tubo con un anello di tenuta toroidale in gomma, si elimina la parte eccedentaria del tessuto. L'anello toroidale di gomma viene quindi fissato con cura all'estremità del tubo per mezzo di vaselina. Il tubo è posizionato con una pinza a molla all'interno in un cilindro contenente una soluzione di 154 mM di $MgSO_4$ (figura 1). Il disco cutaneo deve essere interamente sommerso nella soluzione di $MgSO_4$. È possibile ottenere fino a 10-15 dischi di tessuto cutaneo dalla pelle di un solo ratto. Le dimensioni del tubo e del giunto toroidale sono indicate nella figura 2.

18. Prima di cominciare la sperimentazione, misurare la resistenza elettrica di due dischi cutanei per controllare la qualità della pelle di ciascun animale. I due dischi devono dare valori di resistenza elettrica superiori a 10 kΩ affinché gli altri dischi possano essere utilizzati per il metodo di prova. Se il valore di resistenza è inferiore a 10 kΩ, gli altri dischi della stessa pelle devono essere eliminati.

Applicazione della sostanza chimica in esame e delle sostanze di controllo

19. Controlli positivi e negativi concorrenti devono essere utilizzati per ciascuna batteria di prove (esperimento) in modo da garantire un'adeguata esecuzione del modello sperimentale. Per ciascuna batteria di prove (esperimento) devono essere utilizzati dischi di tessuto cutaneo provenienti da un unico animale. Le sostanze chimiche proposte per i controlli positivi e negativi sono, rispettivamente, l'acido cloridrico 10 M e l'acqua distillata.

▼M8

20. La sostanza chimica liquida in esame (150 µl) è applicata uniformemente sulla superficie epidermica all'interno del tubo. Per il test di sostanze solide, si applica in modo uniforme sul disco di tessuto cutaneo una quantità sufficiente di sostanza in modo da coprire la totalità della superficie dell'epidermide. Dopo avere aggiunto l'acqua deionizzata (150 µl) sulla sostanza solida, agitare delicatamente il tubo. Per ottenere il massimo contatto con la pelle può risultare necessario riscaldare i solidi a 30 °C per sciogliere o rammollire la sostanza chimica in esame o macinarli per ottenere grani o polveri.

21. In ogni batteria di prove (esperimento), sono utilizzati tre dischi di tessuto cutaneo per ciascuna sostanza chimica di prova e di controllo. La sostanza chimica in esame è applicata per 24 ore a 20-23 °C, quindi rimossa con un getto d'acqua corrente a temperatura ambiente fino alla sua completa rimozione.

Misurazione della TER

22. L'impedenza cutanea è determinata misurando la TER per mezzo di un ponte Wheatstone a basso voltaggio e corrente alternata (18). Le specificazioni generali del ponte sono una tensione operativa di 1-3 V, una corrente alternata sinusoidale o rettangolare di 50-1 000 Hz ed un intervallo di misurazione di almeno 0,1-30 kΩ. Il ponte utilizzato nello studio di validazione misura l'induttanza, la capacitanza e la resistenza fino a valori di 2 000 H, 2 000 µF e 2 MΩ, rispettivamente, a frequenze di 100 Hz o 1 kHz, utilizzando valori in serie o paralleli. Ai fini della TER, le misurazioni delle prove di corrosività sono registrate in resistenza ad una frequenza di 100 Hz utilizzando valori in serie. Prima di misurare la resistenza elettrica, la tensione di superficie della pelle è ridotta aggiungendo un volume di etanolo al 70 % sufficiente a coprire l'epidermide. Dopo alcuni secondi, l'etanolo è rimosso dal tubo e il tessuto è idratato con l'aggiunta di 3 ml di soluzione di $MgSO_4$ (154 mM). Gli elettrodi del ponte di misurazione sono posizionati su entrambi i lati del disco di tessuto cutaneo per misurare la resistenza in kΩ/disco di tessuto cutaneo (figura 1). Le dimensioni degli elettrodi e la lunghezza dell'elettrodo esposto al di sotto dei morsetti a coccodrillo sono indicate nella figura 2. Il morsetto attaccato all'elettrodo interno è posto sulla parte superiore del tubo durante la misurazione della resistenza, affinché la lunghezza dell'elettrodo immerso nella soluzione di $MgSO_4$ resti costante. L'elettrodo esterno è posizionato all'interno del cilindro in modo tale da posarsi sul fondo dello stesso. La distanza tra la pinza a molla e la parte inferiore del tubo deve rimanere costante (figura 2), poiché tale distanza influenza il valore di resistenza che si ottiene. Di conseguenza, la distanza tra l'elettrodo interno e il disco di tessuto cutaneo deve essere costante e minima (1-2 mm).

23. Se la misurazione della resistenza dà un valore superiore a 20 kΩ, ciò può essere dovuto ad un residuo della sostanza chimica in esame che copre la superficie epidermica del disco di tessuto cutaneo. Un tentativo di rimozione della sostanza può essere effettuato, ad esempio, turando ermeticamente il tubo con il pollice inguantato ed agitandolo per 10 secondi circa; la soluzione di $MgSO_4$ viene così completamente rimossa e la misurazione della resistenza è ripetuta con una nuova soluzione di $MgSO_4$.

24. Le proprietà e le dimensioni dell'apparecchiatura e la procedura sperimentale utilizzate possono influenzare i valori della TER che si ottengono. La soglia di corrosività è stata fissata a 5 kΩ sulla base di dati ottenuti con l'apparecchiatura e la procedura sperimentale specifiche descritte nel presente metodo di prova. Possono essere applicati diversi valori limite e di controllo nel caso in cui le condizioni sperimentali siano alterate o sia utilizzata una diversa attrezzatura. Pertanto, si raccomanda di calibrare la metodologia ed i valori limite di resistenza testando una serie di sostanze da utilizzare per stabilire la competenza scelte fra le sostanze utilizzate nello studio di validazione (8) (9) o fra classi di sostanze chimiche simili a quelle studiate. Un elenco di idonee sostanze di prova a fini di competenza è proposto nella tabella 1.

▼M8

Metodi di fissazione del colorante

25. L'esposizione ad alcune sostanze non corrosive può comportare una diminuzione della resistenza al di sotto del valore soglia di 5 kΩ e permettere il passaggio di ioni attraverso lo strato corneo riducendo in tal modo la resistenza elettrica (9). Ad esempio, le sostanze organiche neutre e le sostanze tensioattive (compresi detergenti, emulsionanti ed altri agenti di superficie) possono eliminare i lipidi della pelle rendendo in tal modo la barriera più permeabile agli ioni. Di conseguenza, se i valori della TER prodotti da tali sostanze chimiche sono inferiori o vicini a 5 kΩ, in mancanza di lesioni percepibili si deve effettuare una valutazione della penetrazione del colorante sui tessuti di controllo e sui tessuti trattati per determinare se i valori della TER ottenuti sono il risultato della maggiore permeabilità della pelle o della corrosione cutanea (7) (9). In caso di corrosione cutanea con danno dello strato corneo, il colorante sulforodamina B, quando applicato sulla pelle, penetra rapidamente e colora il tessuto sottostante. Questo colorante è stabile con un'ampia gamma di sostanze e non è influenzato dal procedimento di estrazione descritto di seguito.

Applicazione ed eliminazione del colorante sulforodamina B

26. Al termine della valutazione della TER, il solfato di magnesio è rimosso dal tubo ed il tessuto cutaneo è esaminato con cura in cerca di lesioni manifeste. Se non ci sono importanti lesioni manifeste (ad esempio perforazione), 150 µl di una diluizione al 10 % (p/v) di colorante sulforodamina B (rosso acido 52; C.I. 45100; n. CAS 3520-42-1) in acqua distillata sono applicati sulla superficie epidermica di ogni disco di tessuto cutaneo per 2 ore. Questi dischi di tessuto cutaneo vengono successivamente lavati con un getto d'acqua corrente a temperatura ambiente per circa 10 secondi in modo da eliminare il colorante eccedentario/non fissato. Ciascun disco di tessuto cutaneo è rimosso attentamente dal tubo e messo in una fiala (ad esempio, una fiala a scintillazione in vetro da 20 ml) contenente acqua deionizzata (8 ml). Le fiale sono agitate delicatamente per 5 minuti fino ad eliminare qualsiasi eccesso di colorante non fissato. Dopo aver ripetuto la procedura di risciacquo, i dischi di tessuto cutaneo sono rimossi e inseriti in fiale contenenti 5 ml di sodio dodecil solfato (SDS) al 30 % (p/v) in acqua distillata, quindi incubati per una notte a 60 °C.

27. In seguito all'incubazione, ciascun disco di tessuto cutaneo è rimosso e scartato e la soluzione restante è centrifugata per 8 minuti a 21 °C (forza centrifuga relativa ~175 × g). Un campione di 1 ml di supernatante è in seguito diluito in rapporto 1:5 (v/v) (cioè 1 ml + 4 ml) con SDS al 30 % (p/v) in acqua distillata. La densità ottica (OD) della soluzione è misurata a 565 nm.

Calcolo del tasso di colorante

28. Il tasso di sulforodamina B in ciascun disco è calcolato sulla base dei valori di OD (9) (coefficiente di estinzione molare della sulforodamina B a 565 nm = $8{,}7 \times l0^4$; peso molecolare = 580). Il tenore di colorante è determinato per ciascun disco di tessuto cutaneo per mezzo di un'idonea curva di taratura. Un tenore medio è quindi calcolato per le repliche.

Criteri di accettabilità

29. I valori medi della TER sono accettati se i valori dei controlli positivi e negativi effettuati in parallelo si situano entro gli intervalli accettabili di valori per il metodo utilizzato nel laboratorio di prova. Gli intervalli accettabili di resistenza per la metodologia e l'apparecchiatura descritte sono indicati nella tabella seguente:

▼**M8**

Controllo	Sostanza	Intervallo di resistenza (kΩ)
Positivo	10 M acido cloridrico	0,5-1,0
Negativo	Acqua distillata	10-25

30. I valori medi della fissazione del colorante sono accettati a condizione che i valori dei controlli effettuati in parallelo si situino entro gli intervalli accettabili per il metodo. Gli intervalli accettabili di tasso colorante per le sostanze di controllo proposte per la metodologia e l'apparecchiatura descritte sono i seguenti:

Controllo	Sostanza	Intervallo di tasso di colorante (μg/disco)
Positivo	10 M acido cloridrico	40-100
Negativo	Acqua distillata	15-35

Interpretazione dei risultati

31. Il valore limite della TER che discrimina le sostanze chimiche in esame corrosive da quelle non corrosive è stato stabilito nel corso dell'ottimizzazione del metodo di prova, testato in una fase di prevalidazione e confermato in uno studio formale di validazione.

32. Di seguito è descritto il modello predittivo per il metodo di prova della TER su pelle di ratto per valutare la corrosione cutanea (9) (19), associato al sistema di classificazione del GHS delle Nazioni Unite/regolamento CLP.

La sostanza chimica in esame è considerata non corrosiva per la pelle:

i) se il valore medio della TER ottenuto per la sostanza chimica in esame è superiore a (>) 5 kΩ; o

ii) se il valore medio della TER ottenuto per la sostanza chimica in esame è inferiore o uguale a (≤) 5 kΩ; e

— il disco di tessuto cutaneo non presenta alcuna lesione manifesta (ad esempio perforazione), e

— il tasso medio di colorante del disco è inferiore (<) a quello del disco di controllo positivo di 10 M HCl realizzato in parallelo (cfr. il paragrafo 30 per i valori di controllo positivi).

La sostanza chimica in esame è considerata corrosiva per la pelle:

i) se il valore medio della TER ottenuto per la sostanza chimica in esame è inferiore o uguale a (≤) 5 kΩ e se il disco di tessuto cutaneo presenta lesioni manifeste (ad esempio perforazione); o

ii) se il valore medio della TER ottenuto per la sostanza chimica in esame è inferiore o uguale a (≤) 5 kΩ; e

— il disco di tessuto cutaneo non presenta alcuna lesione manifesta (ad esempio perforazione), ma

▼M8

— il tasso medio di colorante del disco è superiore o uguale (≥) a quello del disco di controllo positivo di 10 M HCl realizzato in parallelo (cfr. il paragrafo 30 per i valori di controllo positivi).

33. Una batteria di prove (esperimento) costituito da almeno tre dischi di tessuto cutaneo di replica dovrebbe essere sufficiente per una sostanza chimica in esame, se la classificazione è univoca. Tuttavia, in caso di risultati inconclusivi, tra cui misurazioni discordanti delle repliche e/o una TER media pari a 5 ± 0,5 kΩ, si dovrebbe considerare l'opportunità di eseguire una seconda batteria di prove (esperimento) indipendente, oltre che una terza nell'eventualità di risultati discordanti tra le prime due.

DATI E RELAZIONE

Dati

34. I valori di resistenza (kΩ) e, eventualmente, i valori di tasso medio del colorante (μg/disc) per la sostanza chimica in esame e per i controlli positivi e negativi devono essere presentati sotto forma di tabella e includere i dati di ciascun disco di replica in ogni batteria di prove (esperimento) nonché i valori medi ± SD. Sono riportati tutti gli esperimenti ripetuti. Per ogni sostanza chimica in esame sono riportate le lesioni osservate sui dischi di tessuto cutaneo.

Relazione sull'esecuzione della prova

35. La relazione sull'esecuzione della prova deve comprendere le seguenti informazioni.

Sostanze chimiche in esame e sostanze di controllo:

— sostanza monocostituente: dati di identificazione chimica, come denominazioni IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale, purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc.;

— sostanza multicostituente, UVCB o miscela: caratterizzate nella massima misura possibile con l'identità chimica (cfr. sopra), con la presenza quantitativa e con le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti;

— aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;

— origine, numero del lotto se disponibile;

— trattamento delle sostanze chimiche in esame/sostanze di controllo prima della prova, se applicabile (ad esempio, riscaldamento, frantumazione);

— stabilità della sostanza chimica in esame, data limite di utilizzo, data della nuova analisi, se nota;

— condizioni di conservazione.

Animali utilizzati nella prova:

— ceppo e sesso utilizzati,

— età degli animali in caso d'utilizzo come animali donatori;

— origine, condizioni di alloggio, dieta, ecc.;

— dettagli sulla preparazione della pelle.

▼**M8**

Condizioni sperimentali:

— curve di taratura dell'apparecchiatura di test,

— curve di taratura dell'esecuzione del test di fissazione del colorante, banda passante utilizzata per misurare i valori di densità ottica e intervallo di linearità dell'apparecchio di misurazione (ad esempio spettrofotometro), se del caso;

— dettagli sulla procedura sperimentale utilizzata per le misurazioni della TER,

— dettagli sulla procedura sperimentale utilizzata per la valutazione della fissazione del colorante, se del caso,

— dosi sperimentali utilizzate, durata del o dei periodi di esposizione e temperatura/temperature di esposizione;

— dettagli sulla procedura di lavaggio utilizzata dopo il periodo di esposizione;

— numero dei dischi di tessuto cutaneo di replica utilizzati per sostanza chimica in esame e per sostanza di controllo (positivo e negativo);

— descrizione di qualsiasi modifica del protocollo sperimentale;

— riferimenti a dati storici del modello. Essi dovrebbero includere (elenco non esaustivo):

  i) accettabilità dei valori di controllo positivi e negativi della RET (in kΩ) rispetto agli intervalli della resistenza dei controlli positivi e negativi;

  ii) accettabilità dei valori del tasso di colorante dei controlli positivi e negativi (in μg/disc) rispetto agli intervalli del tasso di colorante dei controlli positivi e negativi;

  iii) accettabilità dei risultati della prova rispetto alla variabilità storica tra i dischi di tessuto cutaneo di replica;

— descrizione dei criteri decisionali/del modello predittivo applicati.

Risultati:

— presentazione sotto forma di tabella dei dati ottenuti dalle prove della TER e della fissazione del colorante (se del caso) per ogni sostanza chimica in esame e sostanza di controllo, per ogni batteria di prove (esperimento) e ogni disco di tessuto cutaneo di replica (per ogni animale e per ogni campione di pelle), medie, deviazioni standard e coefficienti di variazione;

— descrizione di tutti gli effetti osservati;

— risultante classificazione con riferimento al modello predittivo/ai criteri decisionali utilizzati.

Discussione dei risultati

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Disponibile qui: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html].

▼**M8**

(2) Capitolo B.4 del presente allegato: Irritazione/corrosione cutanea acuta.

(3) Capitolo B.40 *bis* del presente allegato: Corrosione cutanea *in vitro*: test su un modello di epidermide umana ricostituita.

(4) Capitolo B.65 del presente allegato: Metodo di prova *in vitro* su membrana-barriera per la corrosione cutanea.

(5) Capitolo B.46 del presente allegato: Irritazione cutanea *in vitro*: test su un modello di epidermide umana ricostituita

(6) OECD (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23, 219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro*12, 483- 524.

(10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.*ATLA*23, 129-147.

(11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(15) OECD (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

(16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. Fd. Chem. *Toxicol.* 24, 507-512.

(17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro:* Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol. In Vitro* 6,191-194.

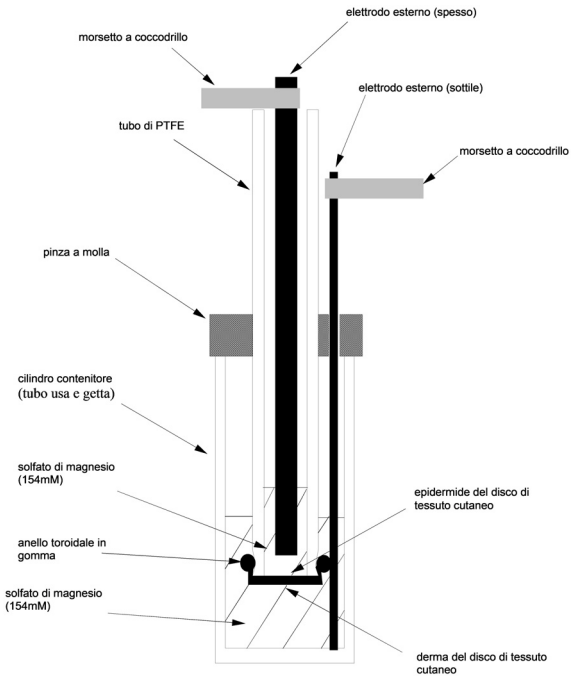
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.

(19) TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

(20) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Devlopment, Paris.

Figura 1

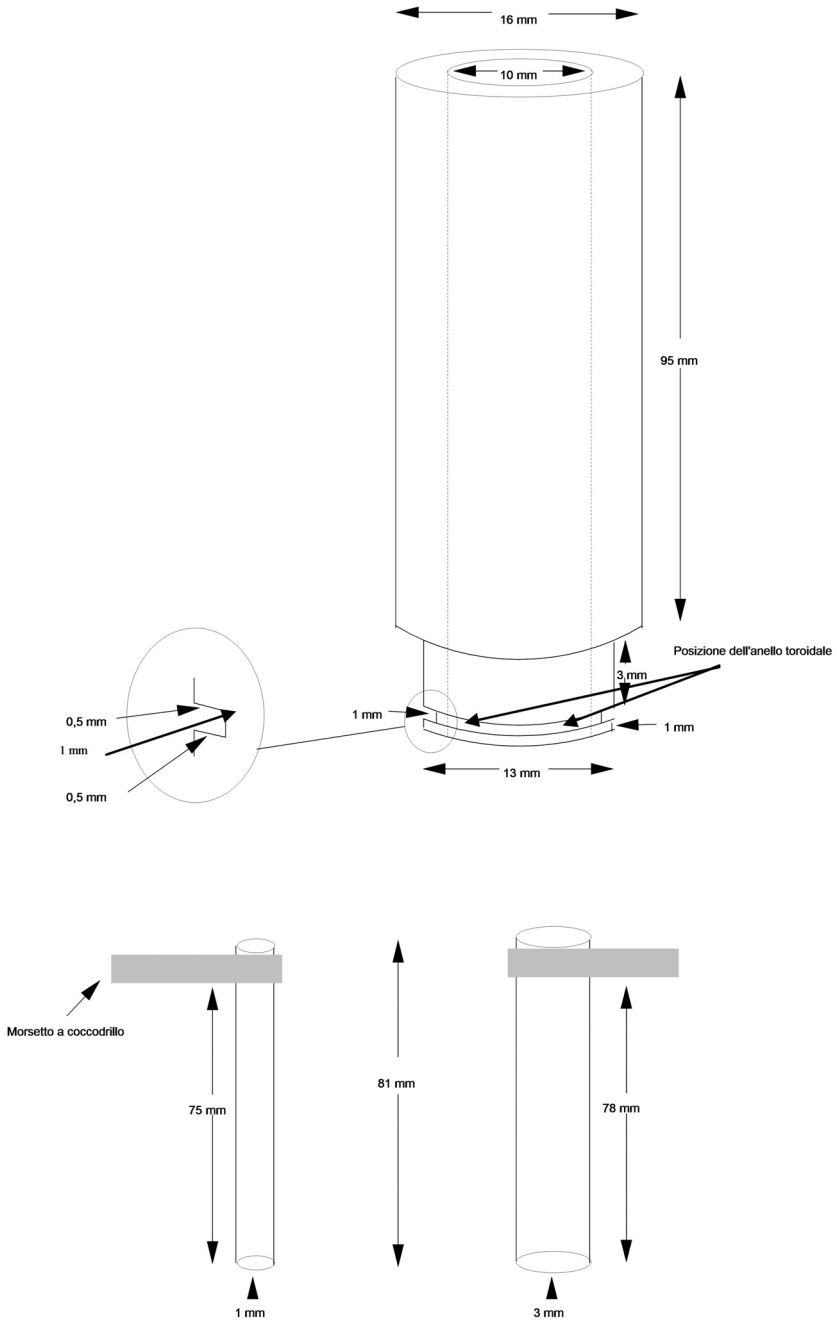
Attrezzatura Per La Prova Di Resistenza Elettrica Transcutanea (Ter) Su Pelle Di RattO



▼**M8**

Figura 2

Dimensioni Del Tubo In Polietrafluoroetilene (Ptfe), Del Cilindro Contenitore E Degli Elettrodi Utilizzati



Fattori critici dell'attrezzatura sopra descritta:

— diametro interno del tubo PTFE,

— lunghezza degli elettrodi relativi al tubo PTFE e al cilindro contenitore: è tale che il disco di tessuto cutaneo non si trova a contatto con gli elettrodi e che una lunghezza standard dell'elettrodo si trova a contatto con la soluzione $MgSO_4$,

▼**M8**

— quantità della soluzione $MgSO_4$ nel cilindro contenitore: la profondità del liquido, rispetto al livello nel tubo PTFE, è tale da apparire come indicato nella figura 1,

— il disco di tessuto cutaneo deve essere fissato accuratamente al tubo PTFE, di modo che la resistenza elettrica sia una misura reale delle proprietà del tessuto cutaneo.

▼**M8**

Appendice

DEFINIZIONI

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo di prova e i valori di riferimento accettati. Misura l'efficienza del metodo di prova e costituisce un aspetto della pertinenza. Il termine è spesso utilizzato come sinonimo di "concordanza" a indicare la percentuale di risultati corretti di un metodo di prova (20).

C: corrosivo.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Concordanza: misura dell'efficacia del metodo di prova per metodi che forniscono un risultato ordinabile in categorie e rappresenta un aspetto della pertinenza. Il termine è usato come sinonimo di "accuratezza" ed è definito come la proporzione di tutte le sostanze chimiche in esame che sono correttamente classificate come positive o negative. La concordanza dipende strettamente dalla prevalenza di risultati positivi in tutti i tipi di sostanze chimiche in esame (20).

Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (UN GHS): sistema di classificazione delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) secondo tipi e livelli standardizzati di rischio fisico, sanitario e ambientale, che elabora i relativi elementi di comunicazione, quali pittogrammi, avvertenze, indicazioni di pericolo, consigli di prudenza e schede informative di sicurezza, per trasmettere informazioni sugli effetti avversi di dette sostanze a tutela delle persone (compresi datori di lavoro, lavoratori, trasportatori, consumatori e personale di pronto intervento) e dell'ambiente (1).

IATA: approcci integrati in materia di prove e valutazioni (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*).

Miscela: una miscela o una soluzione composta di due o più sostanze.

Sostanza monocostituente: sostanza, definita attraverso la sua composizione quantitativa, in cui un costituente principale è presente in percentuale pari ad almeno l'80 % (p/p).

Sostanza multicostituente: sostanza, definita attraverso la sua composizione quantitativa, in cui più costituenti principali sono presenti in concentrazione ≥ 10 % (p/p) e < 80 % (p/p). Una sostanza multicostituente è il risultato di un processo di fabbricazione. La differenza tra miscela e sostanza multicostituente è che una miscela è ottenuta attraverso la miscelazione di due o più sostanze senza che avvenga una reazione chimica. Una sostanza multicostituente è il risultato di una reazione chimica.

NC: non corrosivo.

OD: densità ottica.

PC: controllo positivo, una replica che contiene tutti i componenti di un sistema di prova e che è trattato con una sostanza che notoriamente induce una reazione positiva. Perché sia possibile valutare la variabilità nel tempo della risposta del controllo positivo, l'intensità di tale risposta non dovrebbe essere eccessiva.

▼**M8**

Standard di prestazione: standard, basati su un metodo di riferimento validato, che consentono di valutare la comparabilità di un metodo proposto che è simile sotto il profilo strutturale e funzionale. Detti standard comprendono: i) gli elementi essenziali del metodo di prova; ii) un elenco minimo di sostanze chimiche di riferimento scelte tra le sostanze utilizzate per dimostrare le prestazioni accettabili del metodo di prova validato; e iii) in funzione dei risultati ottenuti con il metodo di riferimento validato, i livelli comparabili di affidabilità e accuratezza che il metodo proposto dovrebbe ottenere quando viene valutato utilizzando l'elenco minimo di sostanze di riferimento.

Pertinenza: descrizione del rapporto tra la prova e l'effetto studiato; indica se la prova è significativa e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui la prova misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende una valutazione dell'accuratezza (concordanza) di una prova (20).

Affidabilità: misura in cui l'esecuzione di un metodo di prova può essere riprodotta nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi seguendo il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità intra-laboratorio e inter-laboratori (20).

Sensibilità: proporzione di tutte le sostanze chimiche positive/attive correttamente classificate dal metodo di prova. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di un metodo di prova (20).

Corrosione cutanea *in vivo*: il manifestarsi di lesioni irreversibili della pelle, vale a dire, necrosi visibile dell'epidermide e del derma, a seguito dell'applicazione della sostanza chimica di prova per non più di quattro ore. Gli effetti tipici della corrosione sono ulcere, sanguinamento, croste sanguinolente e, al termine di un periodo di osservazione di 14 giorni, depigmentazione cutanea dovuta all'effetto sbiancante, chiazze di alopecia e cicatrici. Per valutare le lesioni dubbie potrebbe essere necessario ricorrere a un esame istopatologico.

Specificità: proporzione di tutte le sostanze chimiche negative/inattive correttamente classificate dal metodo di prova. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di un metodo di prova (20).

Sostanza: un elemento chimico e i suoi composti, allo stato naturale od ottenuti per mezzo di un procedimento di fabbricazione, compresi gli additivi necessari a mantenerne la stabilità e le impurezze derivanti dal procedimento utilizzato, ma esclusi i solventi che possono essere separati senza compromettere la stabilità della sostanza o modificarne la composizione.

Batteria di prove: consiste nel testare una sostanza chimica in esame in parallelo su almeno tre dischi di tessuto cutaneo di replica.

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

Resistenza elettrica transcutanea (TER): misurazione dell'impedenza elettrica della pelle, come valore di resistenza espressa in kilo-ohm. Si tratta di un metodo al contempo semplice e affidabile per valutare la funzione di barriera tramite la registrazione del passaggio di ioni attraverso la pelle per mezzo di un ponte di Wheatstone.

UVCB: sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici.

▼M8

B.40. *bis* **CORROSIONE CUTANEA IN VITRO: METODO DI PROVA SU UN MODELLO DI EPIDERMIDE UMANA RICOSTITUITA (RhE)**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼B

B.41. **SAGGIO DI FOTOTOSSICITÀ IN VITRO 3T3 NRU**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼M3

B.42. SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA: LOCAL LYMPH NODE ASSAY

INTRODUZIONE

1. Le linee guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche (OCSE Guidelines for the Testing of Chemicals) e i metodi di prova dell'UE fondati su tali linee guida vengono periodicamente rivisti alla luce dei progressi scientifici, delle mutevoli esigenze in materia di regolamentazione, e di considerazioni relative al benessere degli animali. Il metodo di prova (TM) originale per la determinazione dell'irritazione cutanea nel topo, denominato Local Lymph Node Assay (LLNA; OCSE Test Guideline 429; capitolo B.42 del presente allegato) era stato precedentemente adottato (1) e sono state pubblicate informazioni dettagliate sulla validazione dell'LLNA nonché una revisione delle attività a questa associate (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). L'LLNA aggiornato poggia sulla valutazione dell'esperienza acquisita e dei dati scientifici (12). Questo metodo di prova è il secondo metodo concepito per valutare il potenziale di irritazione cutanea delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) negli animali. L'altro metodo di prova (OCSE Test Guideline 406; capitolo B.6 del presente allegato) fa ricorso a saggi con porcellini d'India, segnatamente il saggio di massimizzazione sui porcellini d'India e il saggio di Buehler (13). L'LLNA offre vantaggi rispetto al metodo B.6 e alla linea guida OCSE Test Guideline 406 (13) dal punto di vista del benessere degli animali. Questo metodo di prova aggiornato sull'LLNA comprende un insieme di standard di prestazione (appendice 1) che può essere usato per valutare lo stato di convalida di metodi di prova nuovi e/o modificati che sono simili, da un punto di vista funzionale e meccanico, all'LLNA, conformemente ai principi del documento orientativo dell'OCSE «OECD Guidance Document n. 34» (14).

2. L'LLNA studia la fase di induzione dell'irritazione cutanea e fornisce dati quantitativi adeguati per la valutazione dose-risposta. Si deve osservare che i sensibilizzanti di tipo leggero/medio che sono raccomandati come sostanze di controllo positivo (PC) per i saggi sui porcellini d'India (ossia metodo B.6; OCSE Test Guideline 406) (13) sono adatti anche per l'LLNA (6) (8) (15). In questo metodo di prova è anche descritta l'opzione di un approccio ridotto all'LLNA (rLLNA), che potrebbe prevedere il ricorso fino al 40 % di animali in meno (16) (17) (18). L'rLLNA potrebbe essere impiegato quando vi sia l'esigenza regolamentare di confermare una previsione negativa di irritabilità cutanea potenziale, purché tutte le altre specifiche del protocollo LLNA siano rispettate, così come descritto nel presente metodo di prova. La previsione di un risultato negativo dovrebbe essere fatta sulla base di tutte le informazioni disponibili elencate al punto 4. Prima di applicare l'approccio rLLNA, devono essere fornite giustificazioni chiare e precise motivazioni scientifiche. Se con l'rLLNA si ottiene, contrariamente alle aspettative, un risultato positivo o equivoco, potrebbe essere necessario effettuare ulteriori saggi per interpretare o chiarire tale risultato. L'rLLNA non è adatto a essere impiegato per l'identificazione dei pericoli delle sostanze irritanti per la cute quando sono necessarie informazioni sulla dose-risposta come la classificazione in una sottocategoria per il regolamento (CE) n. 1272/2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele e per il Sistema mondiale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) delle Nazioni Unite.

DEFINIZIONI

3. Le definizioni utilizzate sono fornite nell'appendice 2.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

4. L'LLNA costituisce un metodo alternativo da usarsi per identificare le sostanze chimiche che provocano sensibilizzazione cutanea. Ciò non significa necessariamente che l'LLNA vada usato in sostituzione del test sui porcellini d'India (ossia B.6; OCSE Test Guideline 406) (13), ma piuttosto che il saggio ha gli stessi meriti e può essere utilizzato in alternativa, poiché

▼M3

i risultati positivi e negativi ottenuti con questo metodo non richiedono generalmente un'ulteriore conferma. Prima di effettuare lo studio, il laboratorio che esegue il test deve consultare tutte le informazioni disponibili sulla sostanza di prova, tra cui l'identità e la struttura chimica, le proprietà chimiche-fisiche, i risultati di eventuali altri test di tossicità in vitro o in vivo eseguiti sulla sostanza e i dati tossicologici su sostanze strutturalmente affini. Queste informazioni devono essere considerate per stabilire l'adeguatezza dell'LLNA per la sostanza (data l'incompatibilità di talune limitate tipologie di sostanze chimiche con l'LLNA — cfr. il punto 5) e servono a scegliere la dose iniziale.

5. L'LLNA è un metodo in vivo e, di conseguenza, non elimina l'impiego di animali nella valutazione dell'attività sensibilizzante da contatto. Esso ha però il potenziale di ridurre il numero di animali necessari a tale scopo. Inoltre, l'LLNA rappresenta un significativo miglioramento (minor sofferenza e dolore fisico) del modo in cui vengono usati gli animali per gli studi sulla sensibilizzazione da contatto. L'LLNA è basato sull'attenta valutazione delle manifestazioni immunologiche stimolate dalle sostanze chimiche durante la fase di induzione della sensibilizzazione. Diversamente dai saggi sui porcellini d'India (ossia B.6; OCSE Test Guideline 406) (13), l'LLNA non richiede la stimolazione di reazioni di ipersensibilità cutanea indotte da provocazione. Inoltre, l'LLNA non richiede l'uso di un adiuvante, come invece è il caso del saggio di massimizzazione sui porcellini d'India (13). Per questo motivo, l'LLNA riduce la sofferenza e il dolore fisico degli animali. Nonostante i vantaggi dell'LLNA rispetto al metodo B.6 e alla linea guida OCSE Test Guideline 406, occorre riconoscere che esistono alcune limitazioni che possono rendere necessario l'impiego del metodo B.6 o della linea guida OCSE Test Guideline 406 (13) (ad esempio, risposte falsi negativi nell'LLNA con alcuni metalli, risposte falsi positivi con alcuni irritanti cutanei [tra cui alcune sostanze della categoria dei tensioattivi] (19) (20), o solubilità della sostanza usata per il saggio). Inoltre, le classi di sostanze chimiche o le sostanze contenenti gruppi funzionali che hanno dimostrato di agire da potenziali fattori di confondimento (21) possono richiedere l'uso dei saggi sui porcellini d'India (ossia B.6; OCSE Test Guideline 406) (13). Infine, in considerazione della limitata banca dati di validazione, che consisteva prevalentemente in formulati pesticidi, l'LLNA ha maggiori possibilità del saggio sui porcellini d'India di fornire un risultato positivo per questi tipi di sostanze (22). Tuttavia, nel sottoporre a prova le formulazioni, si potrebbe valutare l'opportunità di inserire come sostanze di riferimento sostanze simili con risultati noti, per dimostrare che l'LLNA funziona correttamente (cfr. il punto 16). Fatte salve le restrizioni indicate, si dovrebbe ricorrere all'LLNA per testare qualsiasi sostanza, a meno che una sostanza non possieda proprietà che possono interferire con l'accuratezza dello stesso.

PRINCIPIO DEL METODO

6. Il principio fondamentale alla base dell'LLNS è che i sensibilizzanti inducono una proliferazione dei linfociti nei linfonodi responsabili del drenaggio della zona di applicazione della sostanza sperimentale. Tale proliferazione è proporzionale alla dose e alla potenza dell'allergene applicato e costituisce un semplice mezzo per ottenere una misurazione quantitativa oggettiva della sensibilizzazione. La proliferazione è misurata confrontando la proliferazione media osservata in ciascun gruppo sperimentale con quella del controllo trattato con il veicolo (gruppo VC). Occorre determinare il rapporto tra la proliferazione media in ciascun gruppo trattato e quella del gruppo parallelo trattato con veicolo, definito «Indice di stimolazione» (SI), che deve essere ≥ 3 prima che una sostanza sperimentale possa essere ulteriormente classificata come potenziale. Le procedure qui descritte si basano sull'uso della marcatura radioattiva in vivo per misurare un aumento del numero di cellule in fase di proliferazione nei linfonodi auricolari responsabili del drenaggio. È possibile però impiegare anche altri criteri per la valutazione del numero di cellule in fase di proliferazione, a condizione che lo standard di prestazione sia pienamente soddisfatto (appendice 1).

▼M3

DESCRIZIONE DEL SAGGIO

Selezione delle specie animali

7. La specie di elezione per questo saggio è il topo. Vanno usate femmine di topo, giovani adulte, del ceppo CBA/Ca o CBA/J, nullipare e non gravide. All'inizio dello studio, gli animali devono avere un'età compresa fra 8 e 12 settimane e la variazione ponderale degli animali deve essere minima e non superare il 20 % del peso medio. In alternativa, è possibile utilizzare altri ceppi ed esemplari di sesso maschile quando vengano prodotti dati sufficienti a dimostrare che nella risposta all'LLNA non esistono differenze significative specifiche per il ceppo e/o il genere.

Condizioni di alloggio e alimentazione

8. I topi devono essere sistemati in gruppi (23), a meno che non venga fornita una giustificazione scientifica adeguata per la sistemazione dei topi in gabbie singole. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). Sebbene l'umidità relativa debba raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti. Idealmente il valore dovrebbe essere pari al 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua potabile.

Preparazione degli animali

9. Gli animali vanno selezionati in maniera randomizzata, marcati per consentire l'identificazione individuale (ma non mediante marchi per orecchio) e tenuti nelle loro gabbie per almeno cinque giorni prima dell'inizio del dosaggio, per permetterne l'acclimatazione alle condizioni di laboratorio. Prima dell'inizio del trattamento, tutti gli animali vanno esaminati per accertare che non presentino lesioni cutanee visibili.

Preparazione delle soluzioni

10. Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in solventi/veicolo e, se necessario, diluite prima dell'applicazione su un orecchio del topo. Le sostanze liquide possono essere applicate direttamente o diluite prima del dosaggio. Le sostanze chimiche insolubili, come quelle solitamente presenti nei dispositivi medici, dovrebbero essere sottoposte a una procedura di estrazione forzata in un solvente adeguato per individuare tutti i componenti estraibili per la sperimentazione prima dell'applicazione a un orecchio del topo. Le sostanze di prova devono essere preparate quotidianamente, salvo quando siano disponibili dati sulla stabilità che dimostrino che la conservazione è accettabile.

Controllo dell'affidabilità

11. Si utilizzano sostanze chimiche per i controlli positivi (PC) per dimostrare che il saggio è stato eseguito in modo adeguato, rispondendo con una sensibilità appropriata e riproducibile, come una sostanza sperimentale sensibilizzante per la quale l'entità della risposta sia ben caratterizzata. Si raccomanda l'inclusione di una sostanza di controllo parallela, che dimostri la competenza del laboratorio nel condurre il saggio con successo e che consenta di valutare la riproducibilità e la comparabilità all'interno del laboratorio e tra laboratori diversi. Alcune autorità di regolamentazione richiedono inoltre l'uso di un controllo positivo per ciascuno studio; si invitano pertanto gli utilizzatori a consultare le autorità competenti prima di eseguire l'LLNA. Di conseguenza, è auspicabile l'uso routinario di una sostanza di controllo parallela onde evitare la necessità di condurre ulteriori esperimenti su animali per soddisfare obblighi che potrebbero emergere dall'impiego periodico di un controllo positivo (cfr. il punto 12). Il controllo positivo dovrebbe produrre una risposta positiva all'LLNA a un livello di esposizione che si ritiene provochi un aumento dell'indice di stimolazione > 3 rispetto al gruppo di controllo negativo (NC). La dose per il controllo positivo va scelta in modo che non provochi eccessiva irritazione cutanea o

▼M3

tossicità sistemica e che l'induzione sia riproducibile ma non eccessiva (ad esempio, un indice > 20 sarebbe eccessivo). Le sostanze di elezione sono un 25 % di esilcinnamaldeide [Chemical Abstracts Service (CAS) 101-86-0] in acetone: olio d'oliva (4:1, v/v) e un 5 % di mercaptobenzotiazolo (CAS 149-30-4) in *N,N*-dimetilformammide (cfr. l'appendice 1, tabella 1). In determinate circostanze, con adeguata giustificazione, è possibile usare altre sostanze di controllo che rispondano ai criteri di cui sopra.

12. Se da un lato si raccomanda l'inclusione di un gruppo di controllo positivo, possono esservi situazioni in cui l'esame periodico (ossia a intervalli ≤ 6 mesi) della sostanza di controllo può essere appropriato nel caso di laboratori che effettuano l'LLNA regolarmente (ossia con una frequenza non inferiore a una volta al mese) e che hanno a disposizione una banca dati con informazioni storiche consolidate sui controlli positivi, che dimostra la capacità del laboratorio di ottenere risultati accurati e riproducibili con le sostanze di controllo. Un'adeguata competenza nella conduzione dell'LLNA può essere dimostrata senza difficoltà producendo risultati positivi coerenti con i controlli positivi in almeno 10 saggi indipendenti effettuati in un periodo di tempo ragionevole (ossia meno di un anno).

13. Un gruppo di controllo positivo parallelo deve essere incluso ogni volta che viene introdotta una modifica procedurale nell'LLNA (ad esempio, una modifica del personale qualificato, dei materiali e/o dei reagenti usati per il metodo di prova, delle attrezzature impiegate per il metodo di prova, dell'origine degli animali sperimentali), e tali modifiche dovrebbero essere documentate nelle relazioni del laboratorio. Nel valutare la necessità di creare una nuova banca dati storica per documentare la coerenza dei risultati sui controlli positivi occorre prendere in considerazione le conseguenze che tali modifiche producono sull'adeguatezza della banca dati storica pregressa.

14. Gli esaminatori devono essere consapevoli del fatto che la decisione di condurre uno studio sui controlli positivi con cadenza periodica anziché in parallelo ha ripercussioni sull'adeguatezza e sull'accettabilità dei risultati negativi ottenuti senza un controllo positivo parallelo nell'intervallo compreso tra ciascuno studio periodico sul controllo positivo. Per esempio, se in uno studio periodico sui controlli positivi si ottiene un risultato falso negativo, possono essere messi in dubbio i risultati negativi ottenuti sulle sostanze sperimentali nell'intervallo tra l'ultimo studio periodico sul controllo positivo accettabile e lo studio periodico sul controllo positivo ritenuto inaccettabile. Le implicazioni di questi risultati devono essere considerate con estrema attenzione al momento di stabilire se includere i controlli positivi paralleli o se condurre soltanto studi periodici sui controlli positivi. Si deve inoltre valutare la possibilità di utilizzare un numero di animali inferiore nel gruppo dei controlli positivi paralleli, qualora ciò sia scientificamente giustificato e se il laboratorio dimostra, sulla scorta di dati storici specifici per il laboratorio, che è possibile ricorrere a un numero di topi inferiore (12).

15. Sebbene la sostanza di controllo positivo vada sottoposta a saggi nel veicolo che è noto per la sua capacità di provocare una risposta coerente (ad esempio, acetone: olio d'oliva; 4:1, v/v), è possibile che si verifichino alcune situazioni normative nelle quali sarà necessario eseguire il saggio anche in un veicolo non standard (formulazione clinicamente/chimicamente pertinente) (24). Se il controllo positivo parallelo è testato in un veicolo diverso rispetto alla sostanza in esame, si deve inserire per il controllo positivo parallelo un VC distinto.

16. Nei casi in cui si valutano sostanze sperimentali di una specifica classe chimica o nell'ambito di una specifica gamma di risposte, la presenza di sostanze di riferimento può essere utile anche per dimostrare che il metodo di prova funziona correttamente per rilevare il potenziale di irritazione cutanea di queste tipologie di sostanze sperimentali. Le sostanze di riferimento appropriate devono avere le seguenti proprietà:

— somiglianza strutturale e funzionale con la classe della sostanza in esame,

— caratteristiche fisiche/chimiche note,

— dati di supporto provenienti dall'LLNA,

— dati di supporto provenienti da altri modelli animali e/o dall'uomo.

▼M3

PROCEDURA DI PROVA

Numero di animali e livelli di dose

17. Ogni gruppo di saggi comprende almeno quattro animali, sui quali si saggiano almeno tre concentrazioni della sostanza sperimentale, più un gruppo di controllo negativo parallelo trattato solo con il veicolo della sostanza sperimentale e un controllo positivo (parallelo o recente, secondo la politica di laboratorio adottata in considerazione dei punti 11-14). Si deve valutare l'opportunità di testare dosi multiple del controllo positivo, soprattutto se quest'ultimo è sottoposto ad esame con modalità intermittente. Salvo il trattamento con la sostanza in esame, gli animali dei gruppi di controllo vanno manipolati esattamente come quelli dei gruppi sperimentali.

18. La selezione della dose e del veicolo è basata sulle raccomandazioni contenute nelle voci bibliografiche (3) e (5). Le dosi consecutive si selezionano normalmente da una concentrazione appropriata tra le seguenti: 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % ecc. La selezione della concentrazione usata va accompagnata da adeguate motivazioni scientifiche. Ove disponibili, occorre tener conto dei dati tossicologici esistenti (ad esempio, tossicità acuta e irritazione cutanea) e delle informazioni strutturali e fisico-chimiche sulla sostanza sperimentale d'interesse (e/o sulle sostanze strutturalmente affini), nel selezionare le tre concentrazioni consecutive in modo che la concentrazione più elevata massimizzi l'esposizione, evitando al contempo la tossicità sistemica e/o l'eccessiva irritazione cutanea locale (3) (25). In assenza di tali informazioni può essere necessario effettuare un saggio iniziale preliminare (cfr. i punti 21-24).

19. Il veicolo non deve interferire o condizionare il risultato del saggio e va selezionato con l'obiettivo di massimizzare la solubilità per ottenere la concentrazione più elevata possibile, producendo al contempo una soluzione/sospensione adatta all'applicazione della sostanza di prova. I veicoli raccomandati sono acetone, olio di oliva (4:1, v/v), *N,N*-dimetilformammide, metiletilchetone, glicole propilenico e dimetilsulfossido (19), ma è possibile utilizzarne anche altri, fornendo una sufficiente motivazione scientifica. In alcune situazioni può rendersi necessario l'uso di un solvente clinicamente pertinente o la formulazione nella quale la sostanza sperimentale è posta in commercio, come controllo ulteriore. Occorre prestare particolare cura per assicurare che i materiali idrofili vengano incorporati in un sistema veicolare che inumidisce la pelle e non scorre via immediatamente, includendo solventi adeguati (ad esempio, 1 % Pluronic® L92). Vanno pertanto evitati i veicoli completamente acquosi.

20. L'elaborazione dei linfonodi da singoli topi consente di valutare la variabilità interanimale e permette di effettuare un confronto statistico della differenza tra le misurazioni raccolte con la sostanza sperimentale e quelle con il gruppo VC (cfr. il punto 35). Inoltre, quando si raccolgono risultati individuali per ciascun animale è possibile valutare l'opportunità di ridurre il numero di topi nel gruppo del controllo positivo (12). Tra l'altro, alcune autorità di regolamentazione impongono l'obbligo di raccogliere risultati individuali per ciascun animale. Tuttavia, alcune autorità di regolamentazione potrebbero accettare dati aggregati; in questi casi gli utilizzatori possono scegliere se raccogliere dati individuali o aggregati.

Saggio preliminare

21. In assenza di informazioni per determinare la dose più elevata da testare (cfr. il punto 18), è necessario eseguire un saggio preliminare, che consenta di definire il livello di dose appropriato per l'LLNA. Scopo del saggio preliminare è fornire informazioni orientative per la selezione della dose massima di utilizzo nello studio LLNA principale, nel caso in cui non siano disponibili informazioni sulla concentrazione che induce tossicità sistemica (cfr. il punto 24) e/o eccessiva irritazione cutanea locale (cfr. il punto 0). La dose massima utilizzata nel saggio deve corrispondere al 100 % della sostanza sperimentale per i liquidi o alla concentrazione massima possibile per i solidi o le sospensioni.

▼M3

22. Il saggio preliminare è condotto in condizioni identiche allo studio LLNA principale, con la differenza che la proliferazione dei linfonodi non è valutata e che può essere utilizzato un numero inferiore di animali per gruppo di saggi. Si suggerisce di ricorrere a uno o due animali per gruppo di saggi. Tutti i topi sono sottoposti quotidianamente a osservazione per la ricerca di eventuali segni clinici di tossicità sistemica o irritazione locale nel sito di applicazione. Il peso è registrato prima del saggio e prima della sua conclusione (giorno 6). Entrambe le orecchie dei topi sono esaminate per individuare segni di eritema e l'esito dell'ispezione è registrato sulla scorta della tabella 1 (25). Lo spessore dell'orecchio si misura con un apposito misuratore (ad esempio, un micrometro digitale o un micrometro Peacock Dial) il giorno 1 (prima della somministrazione della dose), il giorno 3 (circa 48 ore dopo la prima somministrazione) e il giorno 6. Inoltre, il giorno 6, lo spessore dell'orecchio potrebbe essere calcolato misurando il peso di parti di orecchio prelevate con biopsia dopo la morte dell'animale per eutanasia. Un'irritazione cutanea eccessiva a livello locale è indicata da un punteggio ≥ 3 e/o da un aumento dello spessore dell'orecchio ≥ 25 % in un giorno di misurazione qualsiasi (26) (27). La dose più elevata selezionata per lo studio LLNA principale sarà la dose immediatamente inferiore nella serie di concentrazioni utilizzate per il saggio preliminare (cfr. il punto 18) che non induce tossicità sistemica e/o irritazione cutanea eccessiva a livello locale.

Tabella 1

Scala di valutazione dell'eritema

Osservazione	Punteggio
Nessun segno di eritema	0
Eritema di lieve entità (appena visibile)	1
Eritema ben visibile	2
Eritema da moderato a grave	3
Eritema grave (rosso barbabietola) con formazione di escare che impedisce di valutare l'entità della lesione	4

23. Oltre all'aumento del 25 % dello spessore dell'orecchio (26) (27), per individuare le sostanze irritanti nell'LLNA è stato anche utilizzato un aumento statisticamente significativo dello spessore dell'orecchio nei topi trattati rispetto ai controlli (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Tuttavia, se è vero che possono verificarsi aumenti statisticamente significativi dello spessore dell'orecchio, altrettanto certo è che quando sono inferiori al 25 % non sono associati, nello specifico, a un'eccessiva irritazione (30) (31) (33) (34).

24. Le seguenti osservazioni cliniche possono indicare tossicità sistemica (35) (36) se usate nell'ambito di una valutazione integrata e, pertanto, possono suggerire la dose massima da utilizzare nell'LLNA principale: alterazioni della funzione del sistema nervoso (ad esempio, piloerezione, atassia, tremori e convulsioni); variazioni del comportamento (ad esempio, aggressività, cambiamenti delle attività di toelettatura, marcato cambiamento nel livello di attività); variazioni dei pattern respiratori (ossia variazioni della frequenza e dell'intensità della respirazione come dispnea, boccheggiamento e rantoli) e variazioni nel consumo di cibo e acqua. Inoltre, nella valutazione vanno presi in considerazione segni di letargia e/o assenza di reattività e qualsiasi altro segno di sofferenza e dolore fisico non lieve o momentaneo, o una riduzione ponderale > 5 % dal giorno 1 al giorno 6, oltre che la mortalità. Gli animali moribondi o chiaramente sofferenti o recanti segni gravi e persistenti di sofferenza devono essere sottoposti a eutanasia (37).

▼M3

Protocollo sperimentale dello studio principale

25. Il protocollo sperimentale del saggio è il seguente:

— *Giorno 1:* Identificare e registrare il peso di ciascun animale singolarmente e riportare eventuali elementi emersi all'osservazione clinica. Applicare 25 µL della diluizione appropriata della sostanza sperimentale, del solo veicolo o del controllo positivo (parallelo o recente, a seconda della politica di laboratorio adottata in considerazione dei punti 11-15), sulla parte posteriore di entrambe le orecchie.

— *Giorni 2 e 3:* Ripetere la procedura di applicazione eseguita il giorno 1.

— *Giorni 4 e 5:* Nessun trattamento.

— *Giorno 6:* Registrare il peso di ciascun animale. Iniettare 250 µL di soluzione salina sterile tampone fosfato (PBS) contenente 20 µCi (7,4 × 10^5 Bq) di (^{3}H)-metil timidina triziata a tutti i topi trattati e di controllo, attraverso la vena caudale. In alternativa, iniettare 250 µL di PBS sterile contenente 2 µCi (7,4 × 10^4 Bq) di ^{125}I-iododeossiuridina e 10^{-5}M fluorodeossiuridina a tutti i topi, attraverso la vena caudale. Cinque ore (5 h) dopo, gli animali vanno sottoposti ad eutanasia. Asportare i linfonodi auricolari drenanti di entrambe le orecchie e porli in soluzione salina tampone fosfato per ciascun animale separatamente (sistema del singolo animale), oppure per gruppo sperimentale (sistema del gruppo di trattamento). I particolari e i diagrammi relativi all'identificazione e alla dissezione dei linfonodi si trovano alla voce bibliografica (12). Per un ulteriore controllo della risposta cutanea locale nello studio principale possono essere inclusi nel protocollo altri parametri come il punteggio relativo all'eritema o le misurazioni dello spessore dell'orecchio (ottenute utilizzando un micrometro o mediante biopsie effettuate all'autopsia).

Preparazione delle sospensioni cellulari

26. Mediante attenta disaggregazione meccanica attraverso una rete di acciaio inossidabile con maglie da 200 µm o un'altra tecnica accettabile si prepara una singola sospensione cellulare di cellule linfonodali asportate bilateralmente con il sistema del singolo animale o, in alternativa, con il sistema del gruppo di trattamento. Le cellule linfonodali vanno lavate due volte con abbondante PBS e il DNA è precipitato con acido tricloroacetico al 5 % (TCA) a 4 °C per 18 ore (3). I granuli vanno poi rimessi in sospensione in 1 mL di TCA e quindi trasferiti in fiale di scintillazione contenenti 10 mL di liquido di scintillazione per il conteggio del ^{3}H, oppure trasferiti direttamente in tubi per conteggio gamma per il conteggio dello ^{125}I.

Determinazione della proliferazione delle cellule (radioattività incorporata)

27. L'incorporazione di ^{3}H-metil timidina viene misurata mediante conteggio a β-scintillazione, in disintegrazione per minuto (DPM). L'incorporazione di ^{125}I-iododeossiuridina viene misurata mediante conteggio dello ^{125}I ed espressa ugualmente in DPM. A seconda dell'approccio usato, l'incorporazione viene espressa in DPM/topo (sistema del singolo animale) o DPM/gruppo di trattamento (sistema del gruppo di trattamento).

LLNA ridotto

28. In alcune situazioni, quando c'è l'esigenza regolamentare di confermare una previsione negativa di potenziale irritazione cutanea, si può ricorrere a un protocollo rLLNA opzionale (16) (17) (18) che prevede l'utilizzo di un numero inferiore di animali, purché siano rispettate tutte le altre specifiche del protocollo LLNA riportate in questo metodo di prova. Prima di ricorrere all'approccio rLLNA, devono essere fornite giustificazioni chiare e precise motivazioni scientifiche. Se si ottiene un risultato positivo o equivoco, può essere necessario effettuare altri saggi per interpretare o chiarire il risultato.

▼M3

29. La riduzione del numero di gruppi di trattamento è l'unica differenza tra il protocollo del metodo LLNA e quello del metodo rLLNA; per tale ragione l'rLLNA non fornisce informazioni sul rapporto dose-risposta. Di conseguenza, l'rLLNA non deve essere usato allorché si devono raccogliere tali informazioni. Come l'LLNA effettuato con più dosi, la concentrazione della sostanza sperimentale valutata nell'rLLNA deve essere la concentrazione massima che non induce palese tossicità sistemica e/o eccessiva irritazione cutanea a livello locale nel topo (cfr. il punto 18).

OSSERVAZIONI

Osservazioni cliniche

30. Ogni topo va osservato attentamente almeno una volta al giorno per individuare eventuali segni clinici di irritazione locale nel punto di applicazione o di tossicità sistemica. Tutte le osservazioni vanno registrate sistematicamente e riportate singolarmente per ciascun topo. I piani di controllo devono includere criteri per individuare prontamente gli esemplari che esibiscono tossicità sistemica, eccessiva irritazione cutanea a livello locale o corrosione cutanea per eutanasia (37).

Peso corporeo

31. Come illustrato al punto 25, all'inizio del saggio e al momento della soppressione programmata degli animali per eutanasia occorre determinare il peso dei singoli esemplari.

CALCOLO DEI RISULTATI

32. I risultati vengono espressi, per ciascun gruppo di trattamento, mediante l'indice di stimolazione (SI) medio. Se si utilizza l'approccio a singolo animale, l'indice di stimolazione si ottiene dividendo i valori medi delle DPM per topo calcolate per ogni gruppo di trattamento, compreso il gruppo di controllo positivo, per le medie delle DPM per topo calcolate per il gruppo di controllo trattato con veicolo/solvente. Quindi l'SI medio per i controlli trattati con veicolo è uno. Se si applica il sistema del gruppo di trattamento, l'indice di stimolazione si ottiene dividendo l'incorporazione radioattiva per ciascun gruppo di trattamento per l'incorporazione del gruppo di controllo trattato con veicolo; si ottiene così un SI medio.

33. Il processo decisionale rispetto a una risposta positiva prevede un indice di stimolazione SI $\geq$ 3. Tuttavia, per determinare se un risultato borderline vada considerato positivo possono anche essere utilizzati la potenza della dose-risposta, la significatività statistica e la coerenza del solvente/veicolo oltre che le risposte dei controlli positivi (4)(5)(6).

34. Qualora sia necessario chiarire i risultati ottenuti, occorre prendere in considerazione diverse proprietà della sostanza sperimentale, in particolare se ha un rapporto strutturale con noti sensibilizzanti cutanei, se causa eccessiva irritazione cutanea, nonché la natura della risposta alla dose rilevata. Queste e altre considerazioni sono illustrate in dettaglio in altra sede (7).

35. La raccolta di dati sulla radioattività a livello di singolo animale consentirà di eseguire un'analisi statistica della presenza e del grado di rapporto dose-risposta nei dati. Una qualsiasi analisi statistica potrebbe comprendere una valutazione del rapporto dose-risposta oltre che confronti debitamente aggiustati di gruppi sperimentali (ad esempio, confronti parallelizzati tra gruppo dosato e gruppo VC parallelo). Le analisi statistiche possono includere, ad esempio, la regressione lineare o il test di William per valutare l'andamento della dose-risposta, e il test di Dunnett per confronti parallelizzati. Nella scelta di un metodo adeguato di analisi statistica, lo sperimentatore deve essere consapevole di possibili ineguaglianze delle varianze e di altri problemi correlati che possono richiedere una trasformazione dei dati o un'analisi statistica non parametrica. In ogni caso lo sperimentatore potrebbe dover calcolare l'SI e svolgere analisi statistiche con e senza determinati punti (talvolta denominati «aberranti»).

▼M3

DATI E RELAZIONE

Dati

36. I dati vanno riassunti sotto forma di tabella. Se si utilizza il sistema del singolo animale, si evidenziano i valori delle disintegrazioni per minuto (DPM) per ciascun animale, i valori DPM medi per gruppo e individuali, il termine di errore associato (ad esempio, SD, SEM) e l'indice di stimolazione medio per ciascun gruppo di dose rispetto al gruppo del controllo con veicolo parallelo. Se si utilizza il sistema del gruppo di trattamento, si evidenziano i valori medio/mediano delle DPM e il valore medio degli indici di stimolazione per ciascun gruppo di dose rispetto al gruppo del controllo con veicolo parallelo.

Relazione sull'esecuzione del saggio

37. La relazione sull'esecuzione del saggio deve contenere le seguenti informazioni:

Sostanze di prova e di controllo

— dati di identificazione (ad esempio, numero CAS e numero CE, se disponibili; origine; purezza; impurità note; numero di lotto);

— natura fisica e proprietà fisico-chimiche (ad esempio, volatilità, stabilità, solubilità);

— se si tratta di una miscela, composizione e percentuali relative dei componenti;

Solvente/veicolo

— dati di identificazione (purezza; concentrazione, ove pertinente; volume usato);

— giustificazione per la scelta del veicolo;

Animali sperimentali

— origine dei topi del ceppo CBA;

— condizioni microbiologice degli animali, se note;

— numero, età e sesso degli animali;

— origine degli animali, condizioni di alloggio, dieta ecc.;

Condizioni del saggio

— dettagli relativi alla preparazione e all'applicazione della sostanza di prova;

— giustificazione per la scelta delle dosi, compresi i risultati del saggio preliminare, se eseguito);

— concentrazioni del veicolo e della sostanza e quantità totale di sostanza applicata;

— dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo/origine della dieta, origine dell'acqua);

— dettagli dei programmi di trattamento e di campionamento;

— metodi di misurazione della tossicità;

— criteri per considerare gli studi positivi o negativi;

— dettagli di eventuali deviazioni dal protocollo e spiegazione su come la deviazione influenzi il progetto e i risultati dello studio;

Controllo dell'affidabilità

— riassunto dei risultati del più recente controllo dell'affidabilità, comprese informazioni sulla sostanza, la concentrazione e il veicolo usati;

— dati sui controlli positivi e negativi, paralleli e/o storici, per il laboratorio di prova;

▼M3

— se non è stato incluso un controllo positivo parallelo, la data e la relazione del laboratorio per il controllo positivo periodico più recente e una relazione che riporta nel dettaglio i dati storici sui controlli positivi per il laboratorio, che giustifichi la scelta di base di non effettuare un controllo positivo parallelo;

Risultati

— peso dei singoli topi all'inizio dell'applicazione delle dosi e alla soppressione programmata, oltre che il termine di errore medio e associato (ad esempio SD, SEM) per ciascun gruppo di trattamento;

— momento dell'insorgenza e decorso degli eventuali segni di tossicità, compresa l'irritazione cutanea nel punto di applicazione, per ciascun animale;

— tabella dei valori di DPM individuali (sistema del singolo animale) o valori medi/mediani (sistema del gruppo di trattamento) e dei valori degli indici di stimolazione per ciascun gruppo di trattamento;

— termine di errore medio e associato (ad esempio, SD, SEM) per DPM/animale per ciascun gruppo di trattamento e i risultati dell'osservazione aberrante per ciascun gruppo di trattamento se si ricorre al sistema del singolo animale;

— indice di stimolazione calcolato e un'adeguata misura della variabilità che tenga conto della variabilità interanimale sia nella sostanza sperimentale che nei gruppi di controllo, se si ricorre al sistema del singolo animale;

— rapporto dose-risposta;

— analisi statistiche, ove pertinenti;

Discussione dei risultati

— breve commento sui risultati, sull'analisi dose-risposta e sulle analisi statistiche, ove pertinenti, con una conclusione sulla necessità o meno di considerare la sostanza di prova un sensibilizzante cutaneo.

BIBLIOGRAFIA

(1) OCSE (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OCSE Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol*., 30, 165-169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol*., 93, 13-31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health,* 53, 563-79.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol*., 34, 999-1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 34, 985-997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 36, 327-33.

▼M3

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol*., 146, 49-59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol,* 34: 258-273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol,* 34, 274-286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol,* 34: 249-257.

(12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(13) OCSE (1992), *Skin Sensitisation*. OCSE Guideline for Testing of Chemicals No 406, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) OCSE (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol*., 18, 281-284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.

(17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Available at: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]

(18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

▼**M3**

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71-89.

(25) OCSE (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OCSE Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Available at: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth*., 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) OCSE (1987*), Acute Dermal Toxicity,* OCSE Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(37) OCSE (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation,* Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

Appendice 1

Standard di prestazione per la valutazione di metodi di prova LLNA simili o modificati proposti per l'irritazione cutanea

INTRODUZIONE

1. Scopo degli standard di prestazione (PS) è comunicare il fondamento in base al quale è possibile determinare nuovi metodi di prova, considerati o meno proprietari (ossia tutelati dal diritto d'autore, contrassegnati da marchio, registrati), per avere un'accuratezza e un'affidabilità sufficienti per specifici scopi sperimentali. Tali standard di prestazione, basati su metodi di prova convalidati e accettati, possono essere impiegati per valutare l'affidabilità e l'accuratezza di altri metodi simili (definiti metodi «strutturalmente analoghi»), basati su principi scientifici analoghi, e per misurare o prevedere lo stesso effetto biologico o tossico (14).

2. Prima dell'adozione di un metodo modificato (ossia di potenziali miglioramenti proposti rispetto a un metodo di prova approvato), si dovrebbe effettuare una valutazione per stabilire l'effetto delle modifiche proposte sulla prestazione del saggio e la portata di tali modifiche sulle informazioni disponibili per le altri componenti del processo di convalida. A seconda del numero e della natura delle modifiche proposte, dei dati generati e della documentazione giustificativa di tali modifiche, queste ultime devono essere sottoposte al medesimo processo di convalida descritto per un nuovo saggio o, se del caso, a una valutazione ristretta dell'affidabilità e della pertinenza, sulla scorta di un PS consolidato (14).

3. I metodi simili o le varianti di tali metodi, proposti nel quadro del presente metodo di prova, devono essere valutati per stabilirne l'affidabilità e l'accuratezza, con l'impiego di sostanze chimiche che rappresentano l'intervallo completo dei punteggi di irritazione dell'LLNA. Per evitare un uso ingiustificato degli animali si raccomanda vivamente agli sviluppatori del modello di consultare le autorità competenti prima di iniziare gli studi di convalida, in conformità con il PS e gli orientamenti forniti nell'ambito del presente metodo di prova.

4. Gli standard di prestazione qui specificati fanno riferimento ai seguenti standard armonizzati, usati per valutare la validità di versioni simili o modificate dell'LLNA: US-ICCVAM, EC-ECVAM e Japanese-JaCVAM (12). Il PS consiste di componenti essenziali del metodo di prova, sostanze chimiche di riferimento raccomandate e standard per l'accuratezza e l'affidabilità che il metodo proposto dovrebbe soddisfare o superare.

I. **Componenti essenziali del metodo di prova**

5. Per garantire che un metodo LLNA simile o modificato sia funzionalmente e meccanicamente analogo all'LLNA e misuri il medesimo effetto biologico, nel protocollo del metodo di prova devono essere inserite le seguenti componenti:

— la sostanza sperimentale deve essere applicata a livello locale su entrambe le orecchie del topo;

— la proliferazione dei linfociti deve essere misurata nei linfonodi drenanti dal sito di applicazione della sostanza sperimentale;

— la proliferazione dei linfociti deve essere misurata durante la fase di induzione dell'irritazione cutanea;

▼M3

— per le sostanze sperimentali, la dose più elevata selezionata dovrebbe essere la concentrazione massima che non induce tossicità sistemica e/o eccessiva irritazione cutanea locale nel topo. Per le sostanze chimiche di riferimento positive, la dose massima dovrebbe essere almeno la stessa dei valori EC3 LLNA delle corrispondenti sostanze di riferimento (cfr. la tabella 1) senza produrre tossicità sistemica e/o eccessiva irritazione cutanea locale nel topo;

— in ogni studio deve essere inserito un controllo trattato con veicolo (VC) parallelo e, se del caso, dovrebbe essere usato anche un controllo positivo parallelo;

— devono essere usati almeno quattro animali per gruppo di trattamento;

— possono essere raccolti dati individuali o aggregati.

Se uno qualsiasi di tali criteri non è soddisfatto, gli standard di riferimento non possono essere usati per convalidare il metodo simile o modificato.

II. **Elenco minimo di sostanze chimiche di riferimento**

6. Gli standard armonizzati US-ICCVAM, EC-ECVAM e Japanese-JaCVAM (12) identificano un minimo di 18 sostanze chimiche di riferimento obbligatorie e 4 sostanze di riferimento facoltative (ossia sostanze che hanno prodotto risultati falsi positivi o falsi negativi nell'LLNA rispetto ai risultati ottenuti sull'uomo o sui porcellini d'India (B.6 o OCSE Test Guideline 406) (13), e pertanto offrono l'opportunità di dimostrare un rendimento uguale o migliore rispetto all'LLNA), che sono incluse nello standard di prestazione dell'LLNA. I criteri di selezione per individuare tali sostanze chimiche sono:

— l'elenco delle sostanze chimiche di riferimento conteneva i tipi di sostanze che solitamente vengono testate per il loro potenziale di irritazione cutanea e la gamma di risposte che l'LLNA è in grado di misurare o prevedere;

— le sostanze possedevano strutture chimiche ben definite;

— per ogni sostanza erano disponibili dati dell'LLNA ottenuti da saggi sui porcellini d'India (ossia B.6; OCSE Test Guideline 406) (13) e (se del caso) dati ottenuti dall'uomo;

— le sostanze potevano essere facilmente reperite sul mercato.

Le sostanze chimiche di riferimento raccomandate sono elencate nella tabella 1. Gli studi che utilizzano le sostanze chimiche di riferimento proposte devono essere valutati nel veicolo con cui sono elencate nella tabella 1. Nell'eventualità in cui una sostanza elencata non sia disponibile, con un'adeguata giustificazione possono essere usate altre sostanze che soddisfano i criteri di selezione menzionati.

▼M3

Tabella 1

Sostanze chimiche di riferimento raccomandate per lo standard di Prestazione dell'LLNA

Numero	Sostanze chimiche (1)	CAS	Forma	Veic. (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Gamma EC3 effettiva	LLNA vs. GP	LLNA vs. uomo
1	5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-one (CMI)/2-metil-4-isotiazolin-3-one (MI) (5)	26172-55-4/ 2682-20-4	Liq.	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sol.	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-fenilediammina	106-50-3	Sol	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Cloruro di cobalto	7646-79-9	Sol	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Isoeugenolo	97-54-1	Liq	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-mercaptobenzotiazolo	149-30-4	Sol	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NC	+/+	+/+
7	Citrale	5392-40-5	Liq	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Liq	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Eugenolo	97-53-0	Liq	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Fenil benzoato	93-99-2	Sol	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Alcol cinnamico	104-54-1	Sol	AOO	21	1	10,5-42	NC	+/+	+/+
12	Imidazolidinil urea	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12-48	NC	+/+	+/+
13	Metilmetacrilato	80-62-6	Liq	AOO	90	1	45-100	NC	+/+	+/+
14	Clorobenzene	108-90-7	Liq	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	Isopropanolo	67-63-0	Liq	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

Numero	Sostanze chimiche ([1])	CAS	Forma	Veic. ([2])	EC3 % ([3])	N ([4])	0,5x – 2,0x EC3	Gamma EC3 effettiva	LLNA vs. GP	LLNA vs. uomo
16	Acido lattico	50-21-5	Liq	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	Salicilato di metile	119-36-8	Liq	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	Acido salicilico	69-72-7	Sol	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Sostanze opzionali per dimostrare un migliorato rendimento relativo all'LLNA										
19	Laurilsolfato di sodio	151-21-3	Sol.	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/–	+/–
20	Etilene glicol dimetacrilato	97-90-5	Liq.	MEK	28	1	14-56	NC	+/–	+/+
21	Xilene	1330-20-7	Liq.	AOO	95,8	1	47,9-100	NC	+/ (**)	+/–
22	Cloruro di nichel	7718-54-9	Sol.	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Abbreviazioni: AOO = acetone: olio di oliva (4:1, v/v); CAS = Chemical Abstracts Service Number; DMF = *N,N*-dimetilformammide; DMSO = dimetilsolfossido; DNCB = 2,4-dinitroclorobenzene; EC3 = concentrazione stimata necessaria a produrre un indice di stimolazione pari a 3; GP = risultato del saggio sul porcellino d'India (ossia B. 6 o OCSE Test Guideline 406) (13); HCA = aldeide esil cinnamica; Liq = liquido; LLNA = risultato del saggio local lymph node assay eseguito sui topi (ossia. B. 42 o OCSE Test Guideline 429) (1); MEK = metiletilchetone; NA = non applicabile perché l'indice di stimolazione < 3; NC = non calcolato perché i dati sono stati ottenuti da un unico studio; Sol = solido; Veic. = veicolo del saggio.

(*) Si presume che sia un non irritante nell'uomo, per il fatto che non sono stati raccolti risultati da saggi epicutanei clinici, la sostanza non è stata inclusa come allergene in kit di saggi epicutanei e non sono stati segnalati casi di irritazione nell'uomo.

(**) non sono disponibili dati raccolti da saggi condotti su porcellini d'India.

([1]) Le sostanze chimiche devono essere preparate quotidianamente, salvo qualora siano disponibili dati sulla stabilità che dimostrino che la conservazione è accettabile.

([2]) A causa del potenziale impatto di veicoli diversi sul rendimento dell'LLNA, per ogni sostanza di riferimento deve essere utilizzato il veicolo raccomandato (24)(32).

([3]) Valori medi nel caso in cui fossero disponibili più valori EC3. Per le sostanze negative (ossia con indice di stimolazione < 3) è fornita la concentrazione più elevata testata).

([4]) Numero di studi LLNA da cui sono stati ottenuti dati.

([5]) Disponibile in commercio con la denominazione Kathon CG (CAS 55965-84-9), che è una miscela 3:1 di CMI e MI. Le concentrazioni relative di ciascuna componente vanno dall'1,1 % all'1,25 % (CMI) e dallo 0,3 % allo 0,45 % (MI). Le componenti inattive sono sali di magnesio (dal 21,5 % al 24 %) e nitrato rameico (dallo 0,15 % allo 0,17 %), con la rimanente formulazione dal 74 % al 77 % d'acqua. Kathon CG è messa a disposizione da Sigma-Aldrich e da Rohm and Haas (ora Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Standard di affidabilità e accuratezza definiti**

7. L'accuratezza di un metodo simile o modificato rispetto all'LLNA deve soddisfare o superare gli standard di prestazione dell'LLNA allorché è valutata sulla base delle 18 sostanze di riferimento minime che è obbligatorio utilizzare. Il metodo nuovo o modificato deve poter essere classificato correttamente sulla base di una decisione «sì/no». Tuttavia, il metodo nuovo o modificato potrebbe non classificare correttamente tutte le sostanze chimiche di riferimento minime che devono essere utilizzate. Se, per esempio, uno degli irritanti deboli fosse erroneamente classificato, per dimostrare un rendimento equivalente si potrebbe considerare l'opportunità di spiegarne l'errata classificazione e di fornire dati supplementari adeguati (ad esempio, risultati di saggi che forniscono classificazioni corrette per altre sostanze con proprietà fisiche, chimiche e irritanti simili a quelle della sostanza chimica di riferimento in questione). In questi casi, lo stato di convalida del metodo di prova LLNA nuovo o modificato sarebbe valutato caso per caso.

Riproducibilità all'interno del laboratorio di prova

8. Per stabilire la riproducibilità all'interno del laboratorio che ha eseguito il saggio, un metodo LLNA nuovo o modificato dovrebbe essere valutato utilizzando una sostanza irritante ben caratterizzata nell'LLNA. Pertanto, gli standard di riferimento dell'LLNA sono basati sulla variabilità dei risultati da saggi ripetuti dell'aldeide esil cinnamica (HCA). Al fine di valutare l'affidabilità all'interno del laboratorio che ha eseguito il saggio, i valori soglia della concentrazione stimata (ECt) per l'HCA devono essere ottenuti in quattro distinte occasioni, lasciando trascorrere almeno una settimana tra ciascun test. Una riproducibilità accettabile all'interno del laboratorio è indicata dalla capacità del laboratorio di ottenere, per ciascun saggio con l'HCA, valori ECt compresi tra il 5 % e il 20 %, che rappresentano un intervallo di 0,5-2,0 volte il valore EC3 medio specificato per l'HCA (10 %) nell'LLNA (cfr. la tabella 1).

Riproducibilità tra laboratori

9. Per stabilire la riproducibilità tra laboratori di un metodo LLNA nuovo o modificato si dovrebbero utilizzare due sostanze irritanti ben caratterizzate nell'LLNA. Gli standard di prestazione dell'LLNA dipendono dalla variabilità dei risultati dei saggi condotti con l'HCA e il 2,4-dinitroclorobenzene (DNCB) in laboratori diversi. I valori ECt devono essere ottenuti in maniera indipendente da un unico studio condotto in almeno tre laboratori distinti. Per dimostrare una riproducibilità accettabile tra laboratori, ogni laboratorio dovrebbe ottenere valori ECt del 5 % fino al 20 % per l'HCA e dello 0,025 % fino allo 0,1 % per il DNCB, che rappresentano l'intervallo di 0,5-2,0 volte le concentrazioni EC3 medie specificate per l'HCA (10 %) e il DNCB (0,05 %), rispettivamente, nell'LLNA (cfr. la tabella 1).

▼M3

Appendice 2

Definizioni

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo di prova e i valori di riferimento accettati. Misura l'efficienza del metodo di prova e rappresenta un aspetto della pertinenza. Il termine è usato spesso in modo intercambiabile con «concordanza», per indicare la proporzione di risultati corretti di un metodo di prova (14).

Sostanza di riferimento: sostanza irritante o non irritante usata come standard di confronto rispetto a una sostanza di prova. Una sostanza di riferimento dovrebbe presentare le seguenti proprietà: i) fonte o fonti coerenti e affidabili; ii) analogia strutturale e funzionale alla classe delle sostanze in esame; iii) caratteristiche fisiche/chimiche conosciute; iv) dati di supporto relativi agli effetti noti; v) efficacia nota nell'ambito della reazione auspicata.

Soglia di concentrazione stimata (ECt): concentrazione stimata di una sostanza di prova necessaria a produrre un indice di stimolazione indicativo di una risposta positiva.

Concentrazione stimata tre (EC3): concentrazione stimata di una sostanza di prova necessaria a produrre un indice di stimolazione pari a tre.

Falso negativo: una sostanza di prova erroneamente identificata da un metodo di prova come negativa o non attiva, mentre in realtà si tratta di una sostanza positiva o attiva.

Falso positivo: una sostanza di prova erroneamente identificata da un metodo di prova come positiva o attiva, mentre di fatto si tratta di una sostanza negativa o non attiva.

Pericolo: un potenziale effetto avverso per la salute o l'ambiente. L'effetto avverso si manifesta soltanto se c'è un'esposizione di livello sufficiente.

Riproducibilità fra laboratori: una misura della possibilità che laboratori qualificati diversi, seguendo lo stesso protocollo e testando la stessa sostanza di prova, riproducano risultati qualitativamente e quantitativamente simili. La riproducibilità fra laboratori è determinata nel corso dei processi di pre-validazione e validazione e indica la misura in cui un saggio può essere trasferito efficacemente tra laboratori; è detta anche riproducibilità inter-laboratorio (14).

Riproducibilità all'interno del laboratorio: la misura della possibilità che persone qualificate all'interno del medesimo laboratorio, seguendo un protocollo specifico, replichino efficacemente i risultati di un saggio. È detta anche riproducibilità intra-laboratorio (14).

Test strutturalmente analoghi: espressione che indica un metodo di prova strutturalmente e funzionalmente analogo a un metodo di prova di riferimento convalidato e accettato. Tale metodo di prova potrebbe essere candidato a convalide accelerate (catch-up validation). Usato in maniera intercambiabile con un metodo di prova simile (14).

Osservazione aberrante: un'osservazione aberrante è un'osservazione marcatamente diversa dagli altri valori in un campione casuale di popolazione.

Standard di prestazione (PS): standard basati su un metodo di riferimento convalidato, che consentono di valutare la comparabilità di un metodo proposto simile sotto il profilo strutturale e funzionale. Detti standard comprendono: i) i componenti essenziali del metodo; ii) un elenco minimo di sostanze di riferimento scelte tra le sostanze utilizzate per dimostrare l'accettabilità delle prestazioni del metodo di riferimento convalidato; e iii) in funzione dei risultati ottenuti con il metodo di riferimento convalidato, i livelli comparabili di accuratezza e affidabilità che il metodo proposto dovrebbe ottenere quando viene valutato utilizzando l'elenco minimo di sostanze di riferimento (14).

Metodo di prova proprietario: un metodo di prova la cui fabbricazione e distribuzione è limitata da brevetti, diritti d'autore, marchi ecc.

▼**M3**

Assicurazione della qualità: un processo di gestione in base al quale l'aderenza a standard e requisiti di prova e procedure di registrazione propri di un laboratorio e l'accuratezza del trasferimento dei dati sono valutate da individui indipendenti da coloro che eseguono le prove.

Sostanze chimiche di riferimento: sostanze chimiche selezionate per essere utilizzate nella procedura di convalida, di cui sono già note le risposte nel sistema di prova di riferimento in vitro o in vivo o le specie di interesse. Tali sostanze chimiche dovrebbero essere rappresentative delle classi di sostanze chimiche per le quali si prevede di utilizzare il metodo di prova, e dovrebbero rappresentare l'intera gamma di risposte prevedibili delle sostanze chimiche per le quali il metodo di prova può essere usato, ossia da forte a debole a negativa. Gruppi diversi di sostanze di riferimento possono essere richiesti per le diverse fasi del processo di convalida e per i diversi metodi di prova e utilizzi della prova (14).

Pertinenza: descrizione del rapporto del saggio con l'effetto di interesse e se esso è significativo e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui il saggio misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende una valutazione dell'accuratezza (concordanza) di un metodo di prova (14).

Affidabilità: misura in cui un metodo può essere riprodotto nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi utilizzando il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità intra-laboratorio e inter-laboratorio (14).

Irritazione cutanea: un processo immunologico che si verifica quando un individuo suscettibile è esposto a livello topico a un allergene chimico, che provoca una risposta immunitaria cutanea che può portare allo sviluppo di sensibilizzazione da contatto.

Indice di stimolazione (SI): un valore calcolato per valutare il potenziale di irritazione cutanea di una sostanza di prova, corrispondente al rapporto della proliferazione nei gruppi trattati rispetto a quella del gruppo di controllo trattato contemporaneamente con veicolo.

Sostanza di prova (o sostanza sperimentale): qualsiasi sostanza o miscela testata seguendo il presente metodo di prova.

Metodo di prova convalidato: metodo di prova in base al quale sono stati completati studi di convalida per determinare la rilevanza (compresa l'accuratezza) e l'affidabilità per un fine specifico. Va sottolineato che un metodo di prova convalidato potrebbe non avere un rendimento sufficiente in termini di valori di accuratezza e affidabilità ritenuti accettabili per il raggiungimento dell'obiettivo prefissato (14).

▼B

B.43. **STUDI DI NEUROTOSSICITÀ NEI RODITORI**

1. **METODO**

Questo metodo di saggio è equivalente al metodo OCSE TG 424 (1997).

Il suo scopo è permettere di ricavare le informazioni necessarie per confermare o caratterizzare in modo più accurato la potenziale neurotossicità di sostanze chimiche in animali adulti. Può essere abbinato a metodi esistenti utilizzati per studi di tossicità per dose ripetuta, oppure essere utilizzato in uno studio a sé stante. Per la concezione di studi basati sul suo utilizzo, si raccomanda di consultare il documento orientativo OCSE sulle strategie e sui metodi di sperimentazione riguardanti la neurotossicità (1), in particolare nel caso in cui siano previste modifiche delle osservazioni e dei procedimenti raccomandati per l'uso routinario di questo metodo. Tale documento, infatti, è stato elaborato allo scopo di facilitare la scelta di altri procedimenti da utilizzare in casi specifici.

La valutazione della neurotossicità sullo sviluppo non rientra nell'oggetto di questo metodo.

1.1 INTRODUZIONE

Per la valutazione delle caratteristiche tossiche delle sostanze chimiche, è importante prendere in considerazione la loro capacità potenziale di causare effetti neurotossici. Il metodo utilizzato per i saggi di tossicità sistemica per dose ripetuta prevede già osservazioni intese a individuare una potenziale neurotossicità. Il metodo oggetto del presente documento può essere utilizzato per disegnare uno studio che consenta di ricavare maggiori informazioni o di confermare gli effetti neurotossici osservati negli studi di tossicità sistemica per dose ripetuta. Tuttavia, per talune classi di sostanze chimiche, di cui è nota la potenziale neurotossicità, può essere opportuno utilizzare questo metodo anche in assenza di indicazioni di una potenziale neurotossicità emerse da studi di tossicità sistemica per dose ripetuta. Depongono a favore di questo approccio, ad esempio:

— l'osservazione di segni neurologici o lesioni neuropatologiche in studi di tossicità diversi dagli studi di tossicità per dose ripetuta, oppure

— l'affinità strutturale o altre informazioni che indicano una correlazione tra tali sostanze e neurotossici noti.

L'uso di questo metodo può essere opportuno anche in altri casi; per maggiori indicazioni a questo riguardo, si rimanda alla voce bibliografica (1).

Nell'elaborazione di questo metodo, si è posta particolare attenzione alla possibilità di un suo adattamento a necessità specifiche di conferma della specifica neurotossicità istopatologica e comportamentale di una sostanza chimica, nonché di caratterizzazione e quantificazione delle risposte neurotossiche.

▼B

In passato, si faceva coincidere la neurotossicità con la neuropatia, che comporta lesioni neuropatologiche o disfunzioni neurologiche quali convulsioni, paralisi o tremore. La neuropatia è indubbiamente una manifestazione importante di neurotossicità, ma oggi appare evidente che vi sono molti altri segni di tossicità per il sistema nervoso centrale (p. es. la perdita della coordinazione motoria, i deficit sensoriali, le disfunzioni dell'apprendimento e della memoria) che possono non emergere negli studi sulla neuropatia o in altri tipi di studi.

Questo metodo per la conduzione di studi di neurotossicità ha lo scopo di consentire l'individuazione di effetti neurocomportamentali e neuropatologici di rilievo nei roditori adulti. Gli effetti comportamentali, anche in assenza di modificazioni morfologiche, possono essere indicativi di un effetto avverso sull'organismo; viceversa, non tutte le modificazioni comportamentali sono riconducibili in modo specifico al sistema nervoso centrale. Per questo motivo, tutte le modificazioni osservate devono essere valutate insieme a dati correlati di tipo istopatologico, ematologico o biochimico, nonché a dati riguardanti altri tipi di tossicità sistemica. Ai fini della caratterizzazione e quantificazione delle risposte neurotossiche, questo metodo prevede tra l'altro specifici esami istopatologici e comportamentali che possono essere ulteriormente supportati da indagini elettrofisiologiche e/o biochimiche (1)(2)(3)(4).

I neurotossici possono agire su diversi target del sistema nervoso e con svariati meccanismi. Dato che non esiste un unico insieme di test che permetta di valutare in modo approfondito e completo il potenziale neurotossico di ogni sostanza, può essere necessario ricorrere ad altri test *in vivo* o in vitro specifici per il tipo di neurotossicità osservata o attesa.

Questo metodo di saggio può essere anche usato, insieme alle indicazioni riportate nel documento orientativo OCSE sulle strategie e sui metodi di sperimentazione riguardanti la neurotossicità (1), per disegnare studi che permettano di caratterizzare in modo più accurato la quantificazione dose-risposta o migliorarne la sensibilità in modo da poter stimare meglio il NOAEL (livello in corrispondenza del quale non si osservano effetti avversi) o documentare rischi noti o sospetti associati alla sostanza chimica. Ad esempio, può essere utilizzato per disegnati studi intesi a identificare e valutare il meccanismo o i meccanismi di neurotossicità, oppure a integrare i dati già disponibili ricavati da procedure di base per l'osservazione degli effetti neurocomportamentali o neuropatologici. Non è necessario che tali studi producano gli stessi dati che si ricaverebbero applicando i procedimenti standard raccomandati in questo metodo, se tali dati sono già disponibili e non sono ritenuti necessari per l'interpretazione dei risultati dello studio.

Questo studio di neurotossicità, usato da solo o in abbinamento ad altri studi, permette di ricavare informazioni utili per:

— stabilire se la sostanza chimica esaminata provoca effetti permanenti o reversibili sul sistema nervoso;

— caratterizzare con maggior precisione le alterazioni del sistema nervoso associate all'esposizione alla sostanza chimica, e comprendere il meccanismo alla base di tali alterazioni;

▼B

— determinare le relazioni dose-risposta e tempo-risposta al fine di stimare un livello in corrispondenza del quale non si osservano effetti avversi (a sua volta utilizzabile per stabilire criteri di sicurezza per la sostanza chimica in questione).

Questo metodo di saggio prevede la somministrazione orale della sostanza da esaminare. In talune circostanze può essere preferibile usare altre vie di somministrazione (ad esempio cutanea o per inalazione); in tal caso può essere necessaria una modifica dei procedimenti raccomandati. La via di somministrazione deve essere scelta in funzione del profilo di esposizione negli esseri umani e delle informazioni disponibili sulle caratteristiche tossicologiche o cinetiche.

1.2 DEFINIZIONI

Effetto avverso: alterazione rispetto alle condizioni di base, riferibile al trattamento somministrato, che riduce la capacità di un organismo di sopravvivere, riprodursi o adattarsi all'ambiente.

Dose: quantità di sostanza somministrata. Viene espressa in peso (g, mg), oppure in peso per unità di peso dell'animale usato per il saggio (p. es. mg/kg), oppure concentrazione costante nella dieta (ppm).

Dosaggio: termine generale che indica la dose, la frequenza e la durata della somministrazione.

Neurotossicità: modificazione avversa che si produce nella struttura o nella funzione del sistema nervoso centrale in seguito all'esposizione a un agente chimico, biologico o fisico.

Neurotossico: agente chimico, biologico o fisico potenzialmente in grado di causare neurotossicità.

NOAEL: abbreviazione dell'inglese no observed adverse effect level; designa il livello di dose massimo in corrispondenza del quale non si osservano effetti avversi correlati al trattamento.

1.3 PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

La sostanza chimica in esame viene somministrata per via orale in un range di dosi a diversi gruppi di roditori da laboratorio. Normalmente sono necessarie dosi ripetute, e il regime di somministrazione può essere di 28 giorni, subcronico (90 giorni) o cronico (1 anno o più). I procedimenti indicati in questo metodo sono utilizzabili anche per studi di neurotossicità acuta. Il saggio eseguito sugli animali ha lo scopo di consentire l'individuazione o la caratterizzazione di anomalie del comportamento e/o neurologiche. In ciascun periodo di osservazione viene valutata una serie di comportamenti che potrebbero essere influenzati dai neurotossici. Al termine del saggio, all'interno di ciascun gruppo un sottogruppo di animali di ciascun sesso viene sottoposto a perfusione in situ e prelievo di tessuti del cervello, del midollo spinale e dei nervi periferici, destinati a un successivo esame.

Nel caso di studi a sé stanti condotti per determinare la neurotossicità di una sostanza o per caratterizzarne gli effetti neurotossici, gli animali di ciascun gruppo non utilizzati per la perfusione e il successivo esame istopatologico (vedi tabella 1) possono essere utilizzati per specifici esami neurocomportamentali, neuropatologici, neurochimici o elettrofisiologici allo scopo di completare i dati ricavati dagli esami standard previsti da questo metodo (1). Questi esami supplementari possono essere particolarmente utili qualora osservazioni empiriche o gli effetti attesi indichino che l'azione neurotossica della sostanza in esame si esercita su un tipo specifico di bersaglio. Altrimenti, gli animali rimanenti possono essere utilizzati per valutazioni analoghe a quelle previste da questo metodo nell'ambito di studi di tossicità per dose ripetuta nei roditori.

▼B

Quando gli esami previsti da questo metodo sono abbinati a esami previsti da altri metodi, è necessario disporre di un numero sufficiente di animali per poter eseguire le osservazioni richieste da entrambi gli studi.

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1 **Scelta della specie di animali**

La specie di roditori da preferirsi è rappresentata dal ratto, ma è possibile utilizzare anche altre specie di roditori, fornendone adeguata motivazione. Gli animali utilizzati devono essere adulti giovani e sani appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. Di norma, la somministrazione deve iniziare quanto prima possibile dopo il divezzamento, preferibilmente prima che gli animali abbiano raggiunto le sei settimane di età e in ogni caso prima che abbiano raggiunto le nove settimane di età. Tuttavia, quando questo studio viene eseguito in abbinamento ad altri studi, può essere necessario un aggiustamento del criterio relativo all'età degli animali. All'inizio dello studio, il peso degli animali deve essere del ± 20 % del peso medio per ciascun sesso. Quando uno studio per dose ripetuta di breve durata serve da studio preliminare per uno studio a lungo termine, nei due studi devono essere utilizzati animali dello stesso ceppo e della stessa provenienza.

1.4.2 **Condizioni di stabulazione e di alimentazione**

La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve essere preferibilmente del 50-60 %; in ogni caso deve essere non inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale e alternare 12 ore di luce e 12 ore di oscurità. I rumori forti intermittenti devono essere ridotti al minimo. Per l'alimentazione, si possono utilizzare diete convenzionali da laboratorio con acqua ad libitum. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di garantire un'adeguata miscelazione della sostanza in esame, allorché essa viene somministrata con questo metodo. Gli animali devono essere alloggiati in gabbie individuali o contenenti piccoli gruppi dello stesso sesso.

1.4.3 **Preparazione degli animali**

L'assegnazione al gruppo di trattamento e al gruppo di controllo viene effettuata in modo casuale scegliendo animali giovani e sani. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Gli animali devono essere identificati in modo univoco e tenuti nelle gabbie per almeno 5 giorni prima dell'inizio dello studio, in modo da consentirne l'acclimatazione alle condizioni di laboratorio.

1.4.4 **Via di somministrazione e preparazione delle dosi**

Questo metodo prevede espressamente la somministrazione orale della sostanza da esaminare. La somministrazione può essere effettuata per via intragastrica, con gli alimenti, nell'acqua di bevanda o mediante capsule. Si possono utilizzare anche altre vie di somministrazione (ad es. cutanea o per inalazione), ma in questo caso può essere necessario modificare i procedimenti raccomandati. La via di somministrazione deve essere scelta in funzione del profilo di esposizione degli esseri umani e delle informazioni disponibili sulle caratteristiche tossicologiche o cinetiche. Si devono comunque indicare i motivi della scelta della via di somministrazione e le conseguenti modifiche dei procedimenti previsti da questo metodo.

▼B

Se necessario, la sostanza da esaminare può essere disciolta o sospesa in un veicolo adatto. Ove possibile, si raccomanda di utilizzare una soluzione/sospensione acquosa, oppure, come seconda alternativa, una soluzione/sospensione in olio (per esempio olio di mais), o infine una soluzione/sospensione in altri veicoli. Le caratteristiche di tossicità del veicolo devono essere note. È opportuno inoltre verificare le seguenti caratteristiche del veicolo: effetti del veicolo sull'assorbimento, sulla distribuzione, sul metabolismo o sulla ritenzione della sostanza in esame che potrebbero alterare le caratteristiche tossiche di tale sostanza; ed effetti sul consumo di cibo o di acqua o sullo stato nutrizionale degli animali.

1.5 PROCEDIMENTI

1.5.1 **Numero e sesso degli animali**

Quando lo studio viene condotto come studio a sé stante, ciascun gruppo di trattamento e di controllo deve essere composto almeno da 20 animali (10 femmine e 10 maschi) ai fini della valutazione delle osservazioni cliniche e funzionali dettagliate. Al termine dello studio, almeno cinque maschi e cinque femmine, scelti tra questi 10 maschi e 10 femmine, devono essere sottoposti a perfusione in situ e a esame neuroistopatologico dettagliato. Nei casi in cui solo un numero limitato di animali all'interno di un determinato gruppo di trattamento venga sottoposto a osservazione per rilevare segni di effetti neurotossici, è opportuno includere tali animali tra quelli scelti per la perfusione. Quando lo studio viene condotto in abbinamento a uno studio di tossicità per dose ripetuta, si deve prevedere l'utilizzo di un numero di animali sufficiente per gli obiettivi di entrambi gli studi. Nella tabella 1 è riportato, per varie combinazioni di studi, il numero minimo di animali da utilizzare per ciascun gruppo. Se sono previsti sacrifici intermedi nel corso dello studio, o gruppi di recupero per l'osservazione della reversibilità, della persistenza o della comparsa tardiva di effetti tossici dopo il trattamento, oppure se sono previste osservazioni supplementari, il numero di animali deve essere opportunamente aumentato affinché sia disponibile il numero di animali necessario per l'osservazione e l'esame istopatologico.

1.5.2 **Gruppi di trattamento e gruppo di controllo**

In genere si devono utilizzare almeno tre gruppi di trattamento a dosi diverse e un gruppo di controllo; tuttavia, se la valutazione di altri dati porta a prevedere l'assenza di effetti a una dose ripetuta di 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno, può essere eseguito un saggio limite. Per stabilire le dosi da utilizzare, in mancanza di dati adeguati si può effettuare uno studio preliminare di tipo range finding. Fatta eccezione per la somministrazione della sostanza da esaminare, gli animali del gruppo di controllo devono essere trattati in modo identico agli esemplari del gruppo di controllo. Qualora la sostanza da saggiare venga incorporata in un veicolo, al gruppo di controllo verrà somministrato il medesimo veicolo nel volume massimo utilizzato.

1.5.3 **Controllo di attendibilità**

Il laboratorio che esegue lo studio deve presentare dati che dimostrino la capacità dello stesso di eseguire lo studio, nonché la sensibilità dei procedimenti utilizzati. Tali dati devono provare la capacità di individuare e quantificare, nel modo più opportuno, modificazioni dei diversi endpoint di cui è raccomandata l'osservazione, quali segni autonomici, reattività sensoriale, forza di prensione e attività motoria. Per informazioni su sostanze chimiche che causano vari tipi di risposte neurotossiche e che possono essere utilizzate come sostanze di controllo positivo si rimanda alle voci bibliografiche da (2) a (9). È ammesso l'uso di dati storici, che si raccomanda di aggiornare periodicamente, a condizione che siano identici gli aspetti essenziali dei procedimenti sperimentali. Nuovi dati che dimostrino che i procedimenti continuano a essere sensibili devono essere elaborati ogniqualvolta venga modificato un elemento essenziale del saggio o dei procedimenti.

▼B

1.5.4 **Scelta della dose**

I livelli di dose devono essere scelti tenendo conto di tutti i dati esistenti sulla tossicità e sulle caratteristiche cinetiche della sostanza da esaminare o di sostanze affini. Il livello di dose più elevato deve essere tale da indurre effetti neurotossici o chiari effetti tossici sistemici. Deve essere inoltre definita una serie decrescente di livelli di dose al fine di individuare un'eventuale risposta dose-correlata e l'assenza di effetti avversi osservati al livello di dose più basso (NOAEL). In linea di massima, i livelli di dose devono essere tali da consentire di distinguere gli effetti tossici primari sul sistema nervoso dagli effetti legati alla tossicità sistemica. Per la determinazione dei livelli di dose decrescenti risulta spesso ottimale applicare un fattore di divisione compreso tra due e tre; è comunque preferibile aggiungere un quarto gruppo di studio piuttosto che avere uno scarto eccessivo (ad esempio superiore a un fattore 10) tra un dosaggio e l'altro. Se esistono stime attendibili sull'esposizione umana prevista, se ne deve tenere conto.

1.5.5 **Saggio limite**

Se uno studio effettuato conformemente al metodo descritto con un livello di dose di almeno 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno non produce effetti neurotossici osservabili e se i dati relativi a composti di struttura affine non sono suggestivi di tossicità, può non essere necessario eseguire uno studio completo con tre livelli di dose. In funzione dell'esposizione umana prevista può essere opportuno utilizzare un livello di dose orale più elevato nel saggio limite. Per altri tipi di somministrazione, ad esempio per inalazione o applicazione cutanea, il livello massimo di esposizione realizzabile dipende in molti casi dalle proprietà fisico-chimiche della sostanza da esaminare. La dose da utilizzare in un saggio limite per uno studio di neurotossicità acuta per via orale deve essere di almeno 2 000 mg/kg.

1.5.6 **Somministrazione delle dosi**

La sostanza viene somministrata agli animali giornalmente, sette giorni su sette, per un periodo di almeno 28 giorni. La scelta di somministrare la sostanza cinque giorni alla settimana o per un periodo più breve deve essere opportunamente motivata. Se viene effettuata per via intragastrica, la somministrazione deve avvenire in dose singola mediante sonda gastrica o idonea cannula per intubazione. Il volume massimo di liquido somministrabile in una volta sola dipende dalla taglia dell'animale, ma non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo tranne nel caso delle soluzioni acquose, per le quali si possono prevedere fino a 2 ml/100 g di peso corporeo. Salvo nel caso di sostanze irritanti o corrosive, i cui effetti di norma tendono a esacerbarsi con l'aumentare della concentrazione, la variabilità del volume somministrato deve essere ridotta al minimo variando la concentrazione, in modo da mantenere un volume costante per tutti i livelli di dose.

Se la sostanza in esame è somministrata con la dieta o con l'acqua, è importante verificare che le quantità da utilizzare non alterino il normale bilancio idrico o nutrizionale. Se la sostanza è somministrata con la dieta, si può utilizzare una concentrazione costante nella dieta (ppm) o un livello di dose costante in funzione del peso degli animali, avendo cura di specificare quale sia l'alternativa prescelta. Se la sostanza è somministrata per via intragastrica, la dose deve essere somministrata ogni giorno alla stessa ora e all'occorrenza modificata per mantenere costante il livello di dose rispetto al peso dell'animale. Qualora, prima di uno studio a lungo termine, si effettui uno studio preliminare per dose ripetuta, la dieta degli animali deve essere identica nei due studi. Per gli studi acuti, nel caso in cui non sia possibile effettuare la somministrazione in un'unica dose, si può procedere al frazionamento della stessa e alla somministrazione delle varie frazioni nell'arco di un periodo non superiore a 24 ore.

▼B

1.6 OSSERVAZIONE

1.6.1 **Frequenza delle osservazioni e degli esami**

Negli studi per dose ripetuta, il periodo di osservazione deve coprire il periodo della somministrazione. Negli studi acuti, l'osservazione deve estendersi ai 14 giorni successivi al trattamento. Nel caso degli animali dei gruppi satellite, per i quali è previsto un periodo post-trattamento senza esposizione, l'osservazione deve comprendere anche questo periodo.

Le osservazioni devono essere effettuate con frequenza tale da assicurare la massima probabilità che vengano individuate le anomalie comportamentali e/o neurologiche. Le osservazioni devono essere effettuate preferibilmente ogni giorno alla stessa ora, tenendo conto del periodo probabile di massima intensità degli effetti dopo la somministrazione. La frequenza delle osservazioni cliniche e degli esami funzionali è riassunta nella tabella 2. Se in base ai dati cinetici o di altro tipo ricavati in precedenza appare necessario effettuare le osservazioni o gli esami funzionali in momenti diversi rispetto a quelli previsti o variare i periodi post-osservazione, deve essere elaborato un programma alternativo che consenta di ricavare quante più informazioni possibile. Queste variazioni devono essere adeguatamente motivate.

1.6.1.1 *Osservazione delle condizioni generali di salute e della mortalità/morbilità*

Tutti gli animali devono essere esaminati attentamente almeno una volta al giorno per verificare le condizioni di salute e almeno due volte al giorno per determinare la morbilità e la mortalità.

1.6.1.2 *Osservazioni cliniche dettagliate*

Osservazioni cliniche dettagliate devono essere eseguite su tutti gli animali scelti a questo scopo (vedi tabella 1) una volta prima dell'esposizione iniziale (per consentire un confronto sullo stesso soggetto) e successivamente a diversi intervalli, in funzione della durata dello studio (vedi tabella 2). Nel caso degli animali dei gruppi satellite di recupero, le osservazioni cliniche dettagliate devono essere eseguite al termine del periodo di recupero. Le osservazioni cliniche dettagliate devono essere eseguite fuori dalle gabbie, collocando gli animali in un recinto standard. Le osservazioni devono essere accuratamente registrate, possibilmente utilizzando sistemi di punteggio che comprendano criteri o scale di punteggi esplicitamente definiti dal laboratorio che esegue il saggio per ciascuna delle misurazioni effettuate. Le variazioni delle condizioni sperimentali devono essere minime (non legate sistematicamente al trattamento) e le osservazioni devono essere condotte da osservatori preparati non a conoscenza del trattamento somministrato.

Si raccomanda di eseguire le osservazioni in modo strutturato, così da applicare sistematicamente criteri ben definiti (compresa la definizione del range normale) a ciascun animale in ciascuna osservazione. Il range normale deve essere adeguatamente documentato. Tutti i segni osservati devono essere registrati. Ogniqualvolta ciò sia possibile, deve essere registrata anche l'entità dei segni osservati. Le osservazioni cliniche devono riguardare, tra l'altro, tutte le alterazioni della cute, del pelo, degli occhi e delle mucose, la comparsa di secrezioni ed escrezioni e l'attività autonomica (ad es. lacrimazione, piloerezione, ampiezza pupillare, ritmo respiratorio insolito e/o respirazione attraverso la bocca, anomalie nella minzione o nella defecazione, e variazione di colore dell'urina).

▼B

Deve essere registrata anche ogni risposta inusuale riguardante la posizione del corpo, il livello di attività (ad es. maggiore o minore esplorazione del recinto standard) e la coordinazione dei movimenti. Devono essere inoltre registrate le modificazioni dell'andatura (ad es. andatura anserina, atassia), della postura (ad es. gobba) e della reattività alla manipolazione, al posizionamento o ad altri stimoli ambientali, come pure la presenza di movimenti clonici o tonici, convulsioni o tremori, stereotipi (ad es. tolettatura eccessiva, movimenti inusuali della testa, continuo girare in tondo) o comportamenti insoliti (ad es. tendenza a mordere o tendenza eccessiva a leccarsi, automutilazione, marcia a ritroso, vocalizzazione) o aggressivi.

1.6.1.3 *Esami funzionali*

Analogamente alle osservazioni cliniche dettagliate, anche gli esami funzionali devono essere eseguiti una volta prima dell'esposizione e successivamente a intervalli frequenti in tutti gli animali scelti a questo scopo (vedi tabella 1). La frequenza degli esami funzionali dipende anche dalla durata dello studio (vedi tabella 2). Oltre che agli intervalli indicati nella tabella 2, nei gruppi satellite di recupero devono essere effettuate osservazioni funzionali anche quanto più vicino possibile al sacrificio finale. Tra gli esami funzionali dev'essere compresa la valutazione della reattività sensoriale a stimoli di diverso tipo [ad es. stimoli uditivi, visivi e propriocettivi (5)(6)(7)], della forza di prensione (8) e dell'attività motoria (9). L'attività motoria deve essere misurata con un dispositivo automatizzato in grado di rilevare sia un aumento che una diminuzione della stessa. Se si utilizza un altro sistema, questo deve essere quantitativo e presentare sensibilità e affidabilità dimostrate. Ciascun dispositivo deve essere collaudato per garantire l'affidabilità nel tempo e l'omogeneità delle sue caratteristiche rispetto a quelle degli altri dispositivi. Ulteriori indicazioni sui procedimenti utilizzabili sono contenute nelle voci bibliografiche citate. Se non esistono dati (ad es. struttura-attività, dati epidemiologici, altri studi tossicologici) che indicano i potenziali effetti neurotossici, è opportuno prevedere l'esecuzione di esami più specifici sulla funzione sensoriale e motoria o sull'apprendimento e sulla memoria per valutare in maggior dettaglio questi possibili effetti. Per ulteriori informazioni sugli esami più specifici e sul loro impiego, si rimanda alla voce bibliografica (1).

In via eccezionale, gli animali che presentano segni di tossicità tali da interferire in modo significativo con gli esami funzionali possono essere esclusi da tali esami, fornendone opportuna motivazione.

1.6.2 **Peso corporeo e consumo di cibo/acqua**

Negli studi di durata fino a 90 giorni, tutti gli animali devono essere pesati almeno una volta alla settimana e almeno settimanalmente deve essere determinato il loro consumo di cibo (o di acqua, nel caso in cui la sostanza in esame venga somministrata con l'acqua). Negli studi a lungo termine, tutti gli animali devono essere pesati almeno una volta alla settimana nelle prime 13 settimane e successivamente almeno una volta ogni quattro settimane. Il consumo di cibo (o di acqua, nel caso in cui la sostanza in esame venga somministrata con l'acqua) deve essere misurato almeno una volta alla settimana nelle prime 13 settimane e successivamente a intervalli di circa tre mesi, sempreché non appaia opportuno modificare tale frequenza alla luce dello stato di salute degli animali o di variazioni del loro peso corporeo.

▼B

1.6.3 **Esame oftalmologico**

Per studi di durata superiore a 28 giorni deve essere effettuato un esame oftalmologico, utilizzando un oftalmoscopio o uno strumento equivalente adatto, prima della somministrazione della sostanza in esame e al termine dello studio, preferibilmente su tutti gli animali e in ogni caso almeno sugli animali del gruppo di trattamento a dose elevata e del gruppo di controllo. In presenza di modificazioni degli occhi o di segni clinici che ne indichino l'opportunità, l'esame deve essere effettuato su tutti gli animali. Negli studi a lungo termine, l'esame oftalmologico deve essere effettuato anche alla tredicesima settimana. Gli esami oftalmologici non sono necessari se i relativi dati possono essere ricavati da altri studi di durata e con livelli di dose simili.

1.6.4 **Esami ematologici e biochimici clinici**

Quando lo studio di neurotossicità viene effettuato in abbinamento a uno studio di tossicità sistemica per dose ripetuta, devono essere eseguiti gli esami ematologici e biochimici-clinici previsti dal metodo dello studio di tossicità sistemica. Il prelievo dei campioni deve avvenire in modo da ridurre al minimo i potenziali effetti neurocomportamentali.

1.6.5 **Esame istopatologico**

L'esame neuropatologico deve integrare e ampliare le osservazioni effettuate nella fase *in vivo* dello studio. A tal fine, si deve procedere alla fissazione in situ dei tessuti di almeno 5 animali/sesso/gruppo (vedi tabella 1 e il seguente paragrafo), utilizzando tecniche di perfusione e fissazione generalmente accettate [vedi voce bibliografica (3), capitolo 5 e voce bibliografica (4), capitolo 50]. Tutte le modificazioni macroscopiche osservabili devono essere registrate. Se lo studio è eseguito come studio a sé stante per la valutazione della neurotossicità o la caratterizzazione degli effetti neurotossici, gli animali rimanenti possono essere utilizzati per specifici esami neurocomportamentali (10)(11), neuropatologici (10)(11)(12)(13), neurochimici (10)(11)(14)(15) o elettrofisiologici (10)(11)(16)(17) a integrazione dei test e degli esami qui descritti, o sottoposti anch'essi a esame istopatologico. Questi esami supplementari sono particolarmente utili quando, in base a osservazioni empiriche o agli effetti attesi, si prevede un tipo specifico di neurotossicità o un target specifico (2)(3). In alternativa, gli animali rimanenti possono essere anch'essi utilizzati per le valutazioni patologiche di routine descritte nel metodo relativo agli studi per dose ripetuta.

Tutti i campioni di tessuti, inclusi in paraffina, devono essere colorati con un procedimento di colorazione generale, ad esempio con ematossilina-eosina, quindi sottoposti a esame microscopico. Se si osservano o si sospettano segni di neuropatia periferica, si deve procedere all'esame di campioni di tessuti di nervi periferici inclusi in plastica. In base ai segni clinici, può essere opportuno estendere l'esame ad altri siti o utilizzare procedure di colorazione speciali. Per indicazioni sugli ulteriori siti da esaminare si rimanda alle voci bibliografiche (3)(4). Può essere utile anche utilizzare opportuni coloranti speciali per provare tipi specifici di modificazioni patologiche (18).

▼B

Sezioni rappresentative del sistema nervoso centrale e del sistema nervoso periferico devono essere sottoposte a esame istologico [vedi voce bibliografica (3), capitolo 5 e voce bibliografica (4), capitolo 50]. Di norma, i prelievi tissutali devono essere effettuati almeno su: prosencefalo, area centrale del cervello, compresa una sezione che attraversi l'ippocampo, mesencefalo, cervelletto, ponte, midollo allungato, occhio con nervo ottico e retina, midollo spinale a livello dei rigonfiamenti cervicale e lombare, gangli della radice dorsale, fibre della radice dorsale e ventrale, nervo sciatico prossimale, nervo tibiale prossimale (a livello del ginocchio) e ramificazioni del nervo tibiale a livello dei muscoli del polpaccio. Per il midollo spinale e i nervi periferici, le sezioni devono essere sia trasversali che longitudinali. Deve essere osservata la vascolarizzazione del sistema nervoso. Deve essere esaminato anche un campione di muscolo scheletrico, in particolare dei muscoli del polpaccio. Particolare attenzione deve essere rivolta a punti del SNC e SNP con strutture e modelli cellulari e delle fibre notoriamente molto sensibili all'azione dei neurotossici.

Indicazioni sulle alterazioni neuropatologiche tipiche indotte dall'esposizione a tossici sono contenute nelle voci bibliografiche (3)(4). Si raccomanda di sottoporre i campioni tissutali a un esame articolato in più fasi. Innanzitutto, si devono confrontare sezioni di tessuti prelevati da esemplari del gruppo trattato con dose elevata a sezioni di tessuti prelevati da esemplari del gruppo di controllo. Se non vengono osservate alterazioni neuropatologiche, non sono necessarie ulteriori analisi. Se invece vengono osservate alterazioni neuropatologiche nel gruppo trattato con dose elevata, si procede assegnando un numero di codice ed esaminando sequenzialmente campioni di ciascuno dei tessuti potenzialmente interessati prelevati da esemplari dei gruppi trattati con dose intermedia e con dose bassa.

Se all'esame qualitativo vengono riscontrate alterazioni neuropatologiche, deve essere effettuato un secondo esame su tutte le regioni del sistema nervoso che manifestano tali alterazioni. Dopo aver assegnato un codice a tutte le sezioni prelevate da ciascuna delle regioni potenzialmente interessate in tutti i gruppi trattati, si fanno esaminare le sezioni in modo casuale da persone all'oscuro del significato dei codici e si registrano la frequenza e la gravità di ciascuna lesione. Terminata la classificazione di tutte le regioni di tutti i gruppi trattati, si apre il codice e si procede all'analisi statistica per valutare le relazioni dose-risposta, avendo cura inoltre di descrivere esempi dei diversi livelli di gravità di ciascuna lesione.

I reperti neuropatologici devono essere valutati nel contesto delle osservazioni e misurazioni comportamentali, come pure di altri dati ricavati da studi precedenti o contemporanei sulla tossicità sistemica della sostanza in esame.

2. DATI

2.1 ELABORAZIONE DEI RISULTATI

Devono essere forniti dati individuali su ciascun animale. Inoltre, tutti i dati devono essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo di trattamento o di controllo, il numero di animali all'inizio del saggio, il numero di animali rinvenuti morti durante il saggio o sottoposti a eutanasia, nonché il momento del decesso di ciascun animale morto spontaneamente o sottoposto a eutanasia, il numero di animali che hanno manifestato segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati con indicazione del momento di insorgenza, della durata, del tipo e della gravità degli effetti tossici, il numero di animali che hanno manifestato lesioni, con indicazione del tipo e della gravità delle lesioni.

▼B

2.2 VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati dello studio devono essere valutati in termini di incidenza, gravità e correlazione tra effetti neurocomportamentali e neuropatologici (compresi gli effetti neurochimici o elettrofisiologici, nonché gli effetti riscontrati con gli eventuali esami supplementari effettuati) e qualsiasi altro effetto avverso osservato. Se possibile, i risultati numerici devono essere valutati sulla base di un metodo statistico appropriato e comunemente accettato. I metodi statistici devono essere selezionati durante la fase di progettazione dello studio.

3. **PRESENTAZIONE DEI DATI**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione sul saggio deve includere le seguenti informazioni:

Sostanza in esame:

— natura fisica (compresi isomerismo, purezza e proprietà fisico-chimiche);

— dati identificativi.

Veicolo (se del caso):

— motivazione della scelta del veicolo.

Animali da laboratorio:

— specie/ceppo impiegati;

— numero, età e sesso degli animali;

— provenienza, condizioni di stabulazione, acclimatazione, dieta, ecc.;

— peso di ciascun animale all'inizio del saggio.

Condizioni sperimentali:

— informazioni dettagliate sulla formulazione della sostanza in esame/preparazione della dieta, sulla concentrazione utilizzata, sulla stabilità e sull'omogeneità del preparato;

— dosi somministrate, caratteristiche del veicolo, volume e forma fisica del preparato somministrato;

— modalità precise di somministrazione della sostanza in esame;

— motivazione della scelta dei livelli di dose;

— motivazione della scelta della via e della durata di esposizione;

— se del caso, conversione della concentrazione della sostanza nella dieta o nell'acqua (ppm) in dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno);

— informazioni dettagliate sulla qualità degli alimenti e dell'acqua.

Osservazione e procedimenti del saggio:

— informazioni dettagliate sull'assegnazione degli animali di ciascun gruppo ai sottogruppi destinati alla perfusione;

— informazioni dettagliate sui sistemi di punteggio utilizzati, compresi criteri e scale di punteggio impiegati per ciascuna misurazione effettuata nel corso delle osservazioni cliniche dettagliate;

▼B

— informazioni dettagliate sugli esami funzionali per la valutazione della reattività sensoriale a stimoli di diverso tipo (p. es. uditivi, visivi e propriocettivi), della forza di prensione, dell'attività motoria (comprese indicazioni particolareggiate sui dispositivi automatizzati impiegati per rilevare l'attività); altri esami eseguiti;

— informazioni dettagliate sugli esami oftalmologici e, se del caso, sugli esami ematologici e sugli esami di biochimica clinica con i rispettivi valori di riferimento;

— informazioni dettagliate su specifici esami neurocomportamentali, neuropatologici, neurochimici o elettrofisiologici.

Risultati:

— peso corporeo e relative modificazioni, compreso il peso corporeo al momento del sacrificio;

— consumo di cibo e consumo d'acqua, se del caso;

— dati sulla risposta tossica per sesso e per livello di dose, compresi i segni di tossicità o mortalità;

— natura, gravità e durata (momento di insorgenza e successivo decorso) degli effetti clinici osservati (sia reversibili che non reversibili);

— descrizione dettagliata di tutti i risultati degli esami funzionali;

— reperti necroscopici;

— descrizione dettagliata dei risultati di tutti gli eventuali esami neurocomportamentali, neuropatologici e neurochimici o elettrofisiologici;

— eventuali dati sull'assorbimento e sul metabolismo;

— elaborazione statistica dei risultati, se del caso.

Discussione dei risultati:

— informazioni sulla relazione dose-risposta;

— relazione tra eventuali altri effetti tossici e la conclusione sul potenziale neurotossico della sostanza chimica in esame;

— NOAEL.

Conclusioni:

— viene incoraggiata l'inclusione di una indicazione specifica della neurotossicità complessiva della sostanza chimica esaminata.

4. **RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

(1) OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OCSE, Parigi. In preparazione.

(2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparazione.

(3) World Health Organisation (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

(4) Spencer P.S., Schaumburg H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. A cura di Spencer, P.S. e Schaumburg, H.H., Williams e Wilkins, Baltimora/Londra.

▼B

(5) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

(6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 691-704.

(7) Moser V.C., McDaniel K.M., Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

(8) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., *1,* 233-236.

(9) Crofton K.M., Haward J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reirer L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599-609.

(10) Tilson H.A., Mitchell C.L. (a cura di). (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

(11) Chang L.W. (a cura di). (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

(12) Broxup B. (1991). Neuropathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, 689-695.

(13) Moser V.C., Anthony D.C., Sette W.F., MacPhail R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, 343-352.

(14) O'Callaghan J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, 445-452.

(15) O'Callaghan J.P., Miller D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368-378.

(16) Fox. D.A., Lowndes H.E., Birkamper G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. A cura di Mitchell C.L. Raven Press, New York, pagg. 299-335.

(17) Johnson B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. A cura di Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Williams and Wilkins Co., Baltimora/Londra, pagg. 726-742.

(18) Bancroft J.D., Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Capitolo 17, Neuropathological Techniques. A cura di Lowe, James e Cox, Gordon. Churchill Livingstone.

▼B

Tabella 1

Numero minimo di animali necessari per ciascun gruppo per uno studio di neurotossicità a sé stante o abbinato ad altri studi

	STUDIO DI NEUROTOSSICITÀ ESEGUITO COME:			
	Studio a sé stante	Studio abbinato a uno studio su 28 giorni	Studio abbinato a uno studio su 90 giorni	Studio abbinato a uno studio di tossicità cronica
Numero totale di animali per gruppo	10 maschi e 10 femmine	10 maschi e 10 femmine	15 maschi e 15 femmine	25 maschi e 25 femmine
Numero di animali scelti per gli esami funzionali, comprese le osservazioni cliniche dettagliate	10 maschi e 10 femmine	10 maschi e 10 femmine	10 maschi e 10 femmine	10 maschi e 10 femmine
Numero di animali scelti per la perfusione in situ e l'esame neuroistopatologico	5 maschi e 5 femmine	5 maschi e 5 femmine	5 maschi e 5 femmine	5 maschi e 5 femmine
Numero di animali scelti per le osservazioni sulla tossicità per dose ripetuta/subcronica/cronica, gli esami ematologici, di biochimica clinica, istopatologici, ecc. conformemente alle indicazioni delle rispettive linee guida		5 maschi e 5 femmine	10 maschi † e 10 femmine †	20 maschi † e 20 femmine †
Eventuali osservazioni supplementari	5 maschi e 5 femmine			

† Compresi cinque animali scelti per gli esami funzionali e le osservazioni cliniche dettagliate nello studio di neurotossicità.

▼B

Tabella 2

Frequenza dell'osservazione clinica e degli esami funzionali

Tipo di ossservazioni		Durata dello studio			
		Acuto	28 giorni	90 giorni	Cronico
In tutti gli animali	Condizioni di salute generali	una volta al giorno	una volta al giorno	una volta al giorno	una volta al giorno
	Mortalità/morbilità	due volte al giorno	due volte al giorno	due volte al giorno	due volte al giorno
Negli animali scelti per le osservazioni funzionali	Osservazioni cliniche dettagliate	— prima dell'esposizione iniziale — entro 8 ore dalla somministrazione nel momento di massimo effetto previsto — il 7 e 14 giorno dopo la somministrazione	— prima dell'esposizione iniziale — successivamente una volta alla settimana	— prima dell'esposizione iniziale — una volta durante la prima o seconda settimana di esposizione — successivamente una volta al mese	— prima dell'esposizione iniziale — una volta alla fine del primo mese di esposizione — successivamente ogni tre mesi
	Esami funzionali	— prima dell'esposizione iniziale — entro 8 ore dalla somministrazione nel momento di massimo effetto previsto — il 7° e 14° giorno dopo la somministrazione	— prima dell'esposizione iniziale — durante la quarta settimana di trattamento il più vicino possibile alla fine del periodo di esposizione	— prima dell'esposizione iniziale — una volta durante la prima o seconda settimana di esposizione — successivamente una volta al mese	— prima dell'esposizione iniziale — una volta alla fine del primo mese di esposizione — successivamente ogni tre mesi

▼B

B.44. **ASSORBIMENTO CUTANEO: METODO *IN VIVO***

1. **METODO**

Il presente metodo corrisponde alle linee guida OCSE TG 427 (2004).

1.1 INTRODUZIONE

L'esposizione a molte sostanze chimiche avviene principalmente attraverso la pelle, ma la maggior parte degli studi tossicologici eseguiti su animali da laboratorio ricorre alla somministrazione orale. Lo studio dell'assorbimento percutaneo *in vivo* presentato in queste linee guida fornisce il collegamento necessario per estrapolare, da studi basati sulla somministrazione orale, dati utili per la valutazione dell'innocuità in caso di esposizione cutanea.

Prima di entrare in circolazione, una sostanza deve attraversare molti strati cellulari cutanei. Lo strato cineticamente determinante per la maggior parte delle sostanze è lo strato corneo, costituito da cellule morte. La permeabilità percutanea dipende sia dalla lipofilia della sostanza chimica che dallo spessore dello strato esterno dell'epidermide, nonché da fattori quali il peso molecolare e la concentrazione della sostanza. Generalmente, la pelle dei ratti e dei conigli è più permeabile di quella dell'uomo, mentre la permeabilità cutanea delle cavie e delle scimmie è più simile a quella umana. I metodi di misurazione dell'assorbimento percutaneo possono essere suddivisi in due categorie: metodi *in vivo* e metodi in vitro. Il metodo *in vivo* permette di ottenere buone informazioni sull'assorbimento cutaneo in varie specie animali di laboratorio. Più recentemente sono stati sviluppati i metodi in vitro, basati sul trasporto attraverso un campione di pelle umana o animale, di spessore totale o parziale, verso un serbatoio di fluidi.

Il metodo in vitro è descritto in un altro metodo di prova (1). Ai fini della scelta del metodo più idoneo per una determinata situazione, si raccomanda di consultare il documento dell'OCSE Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies (2), che contiene maggiori informazioni sull'idoneità dei metodi *in vivo* e in vitro.

Il metodo *in vivo* descritto nel presente documento permette di determinare la penetrazione della sostanza di prova attraverso la pelle fino al compartimento sistemico. Questa tecnica è ampiamente utilizzata da molti anni (3) (4) (5) (6) (7). Benché in molti casi sia possibile ricorrere a studi sull'assorbimento percutaneo in vitro, potrebbero esservi situazioni in cui soltanto uno studio *in vivo* permette di ottenere i dati necessari.

Il metodo *in vivo* presenta diversi vantaggi: utilizza un sistema intatto dal punto di vista fisiologico e metabolico, fa ricorso ad una specie comunemente utilizzata negli studi sulla tossicità e può essere adattato in modo da poter essere impiegato su altre specie. Gli svantaggi sono il ricorso ad animali vivi, la necessità di utilizzare sostanze radiomarcate per poter ottenere risultati affidabili, le difficoltà connesse alla determinazione della fase iniziale di assorbimento e le differenze di permeabilità tra la pelle della specie generalmente utilizzata (il ratto) e la pelle umana. La pelle degli animali è generalmente più permeabile, cosicché si rischia di sovrastimare l'assorbimento percutaneo umano (6)(8)(9). Le sostanze caustiche/corrosive non devono essere testate su animali vivi.

▼B

1.2 DEFINIZIONI

Dose non assorbita: la dose presente nell'acqua di risciacquo dell'epidermide dopo esposizione e sul bendaggio non occlusivo, ivi comprese le dosi che evaporano dalla pelle durante l'esposizione.

Dose assorbita (*in vivo*): comprende i residui presenti nell'urina, nell'acqua di risciacquo delle gabbie, negli escrementi, nell'aria espirata (se misurata), nel sangue, nei tessuti (se raccolti) e nella carcassa restante dopo il prelievo della pelle nel punto di applicazione della sostanza.

Dose assorbibile: dose presente sulla o nella pelle dopo il lavaggio.

1.3 PRINCIPIO DEL METODO

La sostanza di prova, preferibilmente radiomarcata, è applicata sulla pelle rasata degli animali in una o più concentrazioni idonee, sotto forma di preparazione rappresentativa delle preparazioni in uso. La preparazione di prova è lasciata a contatto con la pelle per un determinato periodo di tempo, ed è coperta con idoneo bendaggio (non occlusivo, semi-occlusivo o occlusivo) per evitarne l'ingestione. Al termine del periodo di esposizione, il bendaggio è rimosso e la pelle è pulita con un apposito prodotto detergente. Il bendaggio e il materiale utilizzato per la pulizia sono conservati per essere poi analizzati ed è applicato un nuovo bendaggio. Prima, durante e dopo il periodo di esposizione, gli animali sono collocati in gabbie metaboliche individuali e gli escrementi e l'aria espirata nelle diverse fasi sono raccolti ai fini della successiva analisi. Si può evitare di raccogliere l'aria espirata se i dati disponibili sono sufficienti a concludere che la formazione di metaboliti radioattivi è scarsa o assente. Ciascuno studio prevede generalmente l'esposizione di più gruppi di animali alla preparazione di prova. Gli animali di uno dei gruppi sono soppressi alla fine del periodo di esposizione. Gli animali degli altri gruppi sono soppressi successivamente, a intervalli prestabiliti. Al termine del periodo di campionamento, gli animali restanti vengono soppressi, il loro sangue viene raccolto per essere poi analizzato, la zona di pelle su cui era stata applicata la sostanza viene prelevata ai fini della successiva analisi e la carcassa viene esaminata per individuare l'eventuale presenza di materia non escreta. Si procede quindi all'analisi dei campioni con metodi adeguati e alla stima del grado di assorbimento percutaneo (6) (8) (9).

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1 **Scelta della specie animale**

Il ratto è la specie più frequentemente utilizzata, ma possono essere utilizzati anche ceppi glabri e specie che presentano tassi di assorbimento cutaneo più vicini a quelli umani (3) (6) (7) (8) (9). Di preferenza sono impiegati giovani animali adulti sani dello stesso sesso (maschi, ove non espressamente indicato), appartenenti ai ceppi di laboratorio generalmente utilizzati. All'inizio dello studio, la variazione di peso degli animali utilizzati non può superare ± 20 % del peso medio. A titolo di esempio, sono adatti i ratti maschi di peso compreso tra 200 e 250 g, specialmente quelli il cui peso è situato nella metà superiore di tale intervallo.

▼B

1.4.2 **Numero e sesso degli animali**

Per ciascuna preparazione di prova e ciascuna fase di soppressione programmata deve essere utilizzato un gruppo di almeno quattro animali dello stesso sesso. Ciascun gruppo di animali è soppresso a intervalli di tempo differenti, ad esempio alla fine del periodo di esposizione (in genere, 6 o 24 ore) e in momenti successivi (ad esempio, dopo 48 e 72 ore). Se i dati disponibili indicano differenze sostanziali a livello della tossicità cutanea tra maschi e femmine, sarà selezionato il sesso più sensibile. In assenza di dati di questo tipo, si potrà utilizzare indifferentemente l'uno o l'altro sesso.

1.4.3 **Condizioni di stabulazione e di alimentazione**

La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve essere preferibilmente del 50-60 %; in ogni caso deve essere non inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia del laboratorio. L'illuminazione deve essere artificiale, con un'alternanza di 12 ore di luce e 12 ore di buio. Per l'alimentazione, si possono utilizzare diete convenzionali da laboratorio, con cibo liberamente disponibile e acqua potabile in quantità illimitata. Durante lo studio e preferibilmente anche durante il periodo di acclimatazione, gli animali sono alloggiati in gabbie metaboliche individuali. Poiché la fuoriuscita accidentale di cibo e di acqua rischia di compromettere i risultati, sarà necessario ridurre al minimo la probabilità che tale evento si verifichi.

1.4.4 **Preparazione degli animali**

Gli animali sono contrassegnati in modo da poter essere identificati e lasciati nella loro gabbia per almeno cinque giorni prima dell'inizio dello studio, onde permetterne l'acclimatazione alle condizioni del laboratorio.

Al termine del periodo di acclimatazione e circa 24 ore prima della somministrazione della sostanza di prova, si rasa una zona di pelle nella regione delle spalle e del dorso di ciascun animale. Poiché la capacità di penetrazione della pelle danneggiata è diversa da quella della pelle intatta, si deve aver cura di non procurare abrasioni cutanee. Dopo la rasatura e circa 24 ore prima dell'applicazione della sostanza di prova sulla pelle (cfr. sezione 1.4.7), la superficie cutanea è lavata con acetone per rimuovere il sebo. Non è opportuno lavare ulteriormente la pelle con acqua saponata, poiché i residui di sapone rischiano di favorire l'assorbimento della sostanza di prova. La zona di applicazione deve essere abbastanza grande (preferibilmente almeno 10 cm^2) da consentire un calcolo affidabile della quantità di sostanza chimica di prova assorbita per cm^2 di pelle. Una zona di tali dimensioni può essere facilmente individuata in ratti di peso compreso fra 200 e 250 g. Dopo la preparazione, gli animali sono collocati nuovamente nelle gabbie metaboliche.

1.4.5 **Sostanza di prova**

La sostanza di prova è la sostanza di cui si intendono studiare le caratteristiche di penetrazione. Preferibilmente tale sostanza deve essere radiomarcata.

1.4.6 **Preparazione della sostanza di prova**

La preparazione della sostanza di prova (ad esempio, materiale puro, diluito o formulato contenente la sostanza di prova e applicato sulla pelle) deve essere la stessa a cui possono essere esposti gli esseri umani o le altre specie potenzialmente interessate, o un adeguato sostituto. Qualsiasi variazione dalla preparazione d'uso deve essere giustificata. Ove necessario, la sostanza di prova è disciolta o sospesa in un veicolo adeguato. Per veicoli diversi dall'acqua, devono essere note le caratteristiche di assorbimento e l'interazione potenziale con la sostanza di prova.

▼B

1.4.7 **Applicazione sulla pelle**

Si delimita sulla superficie cutanea una zona di applicazione di dimensioni prestabilite. Successivamente si applica su questa zona, in maniera uniforme, una quantità nota della preparazione di prova. Normalmente la quantità applicata deve simulare l'esposizione umana potenziale (generalmente 1-5 mg/cm^2 per i solidi e fino a 10 $\mu l/cm^2$ per i liquidi). L'utilizzo di altre quantità deve essere giustificato in base alle condizioni di uso previste, agli obiettivi dello studio o alle caratteristiche fisiche della preparazione di prova. Dopo l'applicazione, la zona di pelle trattata deve essere protetta in modo che l'animale non possa effettuare la tolettatura. La figura 1 mostra un esempio di dispositivo tipicamente utilizzato a tal fine. Normalmente la zona di pelle su cui è effettuata l'applicazione è protetta con un bendaggio non occlusivo (ad es. garza di nylon permeabile). Tuttavia, in caso di applicazioni illimitate occorre un bendaggio occlusivo. Qualora il saggio riguardi sostanze semivolatili, se l'evaporazione provoca una riduzione inaccettabile del tasso di recupero della sostanza di prova (cfr. anche la prima parte del punto 1.4.10) è necessario raccogliere la sostanza evaporata in un filtro a carbone che copra il dispositivo di applicazione (cfr. figura 1). È importante che il dispositivo utilizzato non danneggi la pelle e non assorba il preparato di prova né reagisca con esso. Gli animali sono poi nuovamente collocati nelle gabbie metaboliche individuali per la raccolta degli escrementi.

1.4.8 **Durata dell'esposizione e campionamento**

La durata dell'esposizione è l'intervallo di tempo tra l'applicazione e la rimozione del preparato di prova mediante lavaggio della pelle. Il periodo di esposizione utilizzato (normalmente 6 o 24 ore) deve essere scelto in funzione della probabile durata dell'esposizione umana. Dopo il periodo di esposizione, gli animali sono tenuti nelle gabbie metaboliche fino alla loro soppressione programmata e sono sottoposti ad osservazione periodica per l'intera durata del saggio, onde rilevare eventuali segni di tossicità o reazioni anomale. Al termine del periodo di esposizione la pelle trattata deve essere esaminata al fine di rilevare segni visibili di irritazione.

Le gabbie metaboliche devono consentire la raccolta separata dell'urina e delle feci durante tutto lo studio, nonché la raccolta del biossido di carbonio 14C e dei composti volatili del carbonio 14C, che devono essere analizzati qualora siano prodotti in quantità significativa (> 5 %). L'urina, le feci e i fluidi trattenuti (ad es. il biossido di carbonio 14C e i composti volatili del carbonio 14C) devono essere raccolti individualmente per ciascun gruppo in ciascun intervallo di campionamento. Se i dati disponibili sono sufficienti a concludere che la formazione di metaboliti radioattivi volatili è scarsa o assente, è possibile utilizzare gabbie aperte.

Gli escrementi sono raccolti durante il periodo di esposizione e fino a 24 ore dopo il contatto iniziale con la pelle, e in seguito con cadenza giornaliera fino alla fine dell'esperimento. Se normalmente sono sufficienti tre intervalli di raccolta degli escrementi, potrebbe essere opportuno prevedere intervalli di tempo supplementari o più pertinenti per lo studio, a seconda della finalità alla quale è destinata la preparazione di prova o dei dati cinetici esistenti.

Al termine del periodo di esposizione il dispositivo di protezione è rimosso da ogni animale e conservato ai fini della successiva analisi. La pelle trattata deve essere lavata almeno 3 volte con un prodotto detergente, utilizzando appositi tamponi. Occorre fare attenzione per evitare di contaminare altre parti del corpo. Il prodotto detergente deve essere rappresentativo delle normali pratiche igieniche (ad es. una soluzione acquosa di sapone). Infine, la pelle deve essere asciugata. Tutti i tamponi e i residui del lavaggio devono essere conservati per essere poi analizzati. Agli animali appartenenti ai gruppi da sottoporre ad ulteriori osservazioni viene applicato un nuovo bendaggio prima del ritorno nelle gabbie individuali.

▼B

1.4.9 **Procedure finali**

I singoli animali di ciascun gruppo sono soppressi al momento previsto e il loro sangue è raccolto e analizzato. Il bendaggio o dispositivo di protezione è rimosso e analizzato. La pelle del punto di applicazione e una zona simile di pelle rasata non trattata sono prelevate da ciascun animale e analizzate separatamente. La pelle del punto di applicazione può essere frazionata per separare lo strato corneo dall'epidermide sottostante e ottenere in tal modo maggiori informazioni sulla distribuzione della sostanza di prova. La determinazione di tale distribuzione in un periodo di tempo predefinito dopo il periodo di esposizione dovrebbe fornire alcune indicazioni sul destino della sostanza di prova eventualmente presente nello strato corneo. Per facilitare il frazionamento della pelle (dopo il lavaggio finale e la soppressione dell'animale) viene rimosso il bendaggio protettivo. La pelle del punto di applicazione, insieme ad un'areola di pelle circostante, è asportata dal ratto e fissata su una tavola. Con una leggera pressione, viene applicata sulla pelle una striscia di nastro adesivo, che viene poi rimossa insieme a parte dello strato corneo. Successivamente sono applicate altre strisce di nastro adesivo fino al momento in cui, essendo stato rimosso tutto lo strato corneo, il nastro cessa di aderire alla superficie della pelle. Tutte le strisce di adesivo utilizzate per lo stesso animale possono essere messe insieme in un unico recipiente, nel quale viene aggiunta una sostanza per la digestione dei tessuti, al fine di solubilizzare lo strato corneo. Tutti i tessuti potenzialmente interessati possono essere asportati e sottoposti a misurazione separata prima di analizzare il resto della carcassa per stabilire la dose assorbita da quest'ultima. Le carcasse dei singoli animali devono essere conservate ai fini della successiva analisi. Normalmente è sufficiente l'analisi del contenuto totale. Gli organi potenzialmente interessati possono essere asportati per essere analizzati individualmente (se indicato da altri studi). L'urina presente nella vescica al momento della soppressione è aggiunta all'urina raccolta in precedenza. Dopo la raccolta degli escrementi presenti nelle gabbie metaboliche al momento della soppressione programmata, le gabbie e i sistemi di raccolta devono essere lavati con un solvente adeguato. Occorre inoltre analizzare gli altri materiali potenzialmente contaminati.

1.4.10 **Analisi**

In tutti gli studi si deve ottenere un tasso di recupero adeguato (l'obiettivo deve essere una media di 100 ± 10 % della radioattività). L'eventuale scostamento da questi valori deve essere giustificato. La quantità di dose somministrata presente in ciascun campione deve essere analizzata mediante procedure opportunamente convalidate.

Le analisi statistiche devono prevedere la misurazione della varianza tra le diverse repliche di ciascuna applicazione.

2. **DATI**

Per determinare la presenza della sostanza di prova e/o di metaboliti per ciascun animale e a ciascun tempo di campionamento occorre effettuare le misurazioni di seguito indicate. Oltre ad essere presentati individualmente, i dati devono essere raggruppati in funzione dei tempi di campionamento e devono essere riportati sotto forma di medie.

— quantità associata ai dispositivi di protezione;

— quantità che può essere rimossa dalla pelle;

— quantità presente sulla o nella pelle e non eliminabile con il lavaggio;

▼B

— quantità presente nel campione di sangue;

— quantità presente negli escrementi e nell'aria espirata (eventualmente);

— quantità esistente nella carcassa e negli organi eventualmente asportati in vista di un'analisi individuale.

La quantità della sostanza di prova e/o dei metaboliti presenti negli escrementi, nell'aria espirata, nel sangue e nella carcassa permetterà di determinare la quantità totale assorbita in ogni intervallo di tempo. Potrà inoltre essere calcolata la quantità di sostanza chimica di prova assorbita per cm^2 di pelle esposta nel corso del periodo di esposizione.

3. **RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DELLA PROVA**

3.1 RAPPORTO DI PROVA

Il rapporto di prova deve contenere i dati richiesti dal protocollo, in particolare la giustificazione del sistema utilizzato, nonché le seguenti informazioni:

Sostanza di prova:

— dati identificativi [ad es. numero CAS, se disponibile; purezza (purezza radiochimica); impurità note; numero di lotto];

— natura fisica, proprietà fisicochimiche (ad es. pH, volatilità, solubilità, stabilità, peso molecolare e coefficiente di ripartizione — log P_{OW}).

Preparazione della sostanza di prova:

— formulazione e giustificazione dell'utilizzo;

— informazioni dettagliate riguardanti la preparazione della sostanza di prova, la quantità applicata, la concentrazione raggiunta, il veicolo impiegato, la stabilità e l'omogeneità.

Animali da laboratorio:

— specie/ceppo utilizzato;

— numero, età e sesso degli animali;

— provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.;

— peso dei singoli animali all'inizio dell'esperimento.

Condizioni di prova:

— modalità di somministrazione della preparazione di prova (punto di applicazione, metodi di determinazione, bendaggio occlusivo/non occlusivo, volume, estrazione, rilevazione);

— informazioni dettagliate sulla qualità del cibo e dell'acqua.

Risultati:

— eventuali segni di tossicità;

— tabella dei valori di assorbimento (espressi sotto forma di tasso, quantità o percentuale);

▼B

— recuperi totali del saggio;

— interpretazione dei risultati, comparazione con i dati eventualmente esistenti sull'assorbimento percutaneo del composto di prova.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **BIBLIOGRAFIA**

1. Metodo di prova B.45. Assorbimento cutaneo: *In vitro* Method.

2. OCSE (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OCSE, Parigi.

3. ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

4. Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8(5), 829-835.

5. Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

6. EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

7. EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

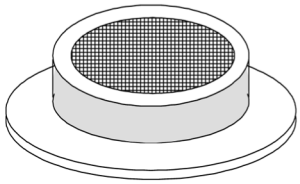
8. Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369-373.

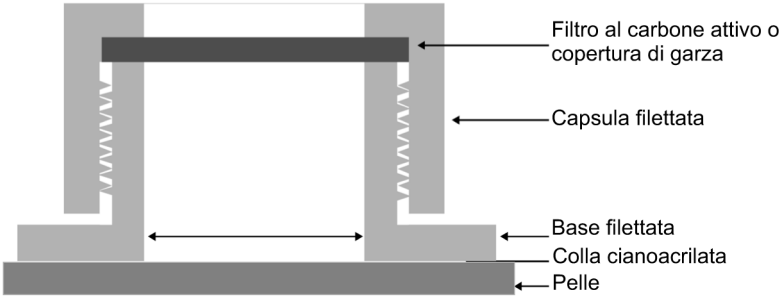
9. Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54, 399-404.

▼B

Figura 1

Esempio di dispositivo generalmente utilizzato per delimitare e proteggere il punto di applicazione cutanea durante gli studi di assorbimento percutaneo *in vivo*





▼B

B.45. **ASSORBIMENTO CUTANEO: METODO IN VITRO**

1. **METODO**

Il metodo di seguito descritto corrisponde alle linee guida dell'OCSE TG 428 (2004).

1.1. INTRODUZIONE

Questo metodo è stato elaborato per ottenere informazioni sull'assorbimento di una sostanza di prova applicata su un campione di pelle asportata. Può essere associato al metodo di assorbimento cutaneo *in vivo* (1), o essere eseguito da solo. Si raccomanda di consultare il documento orientativo dell'OCSE sullo svolgimento di studi concernenti l'assorbimento cutaneo [*OECD Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies* (2)] per l'elaborazione di studi che si basano su questo metodo. Tale documento è stato elaborato per agevolare la selezione di procedure in vitro adeguate, da utilizzare in circostanze specifiche al fine di garantire l'affidabilità dei risultati ottenuti con tale metodo.

I metodi per la misurazione dell'assorbimento cutaneo e della diffusione cutanea possono essere divisi in due categorie: *in vivo* e in vitro. I metodi *in vivo* per la valutazione dell'assorbimento cutaneo sono di uso comune e forniscono informazioni di carattere farmacocinetico per una serie di specie animali. In un altro metodo di prova (1) viene descritto un metodo *in vivo*. I metodi in vitro sono anche utilizzati da molti anni per misurare l'assorbimento cutaneo. Sebbene non siano stati eseguiti studi di validazione ufficiale dei metodi in vitro di cui al presente metodo, gli esperti dell'OCSE hanno convenuto nel 1999 che esistevano dati sufficienti a sostegno del metodo in vitro (3). Ulteriori informazioni in questo senso, in particolare un numero importante di confronti diretti tra i metodi in vitro e *in vivo*, sono contenuti nel documento orientativo (2). Varie monografie trattano questo tema e forniscono informazioni dettagliate sull'uso del metodo in vitro (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12). I metodi in vitro misurano la diffusione di sostanze chimiche nella pelle e attraverso la pelle verso un serbatoio di fluidi e possono servirsi di campioni di pelle non vitale per misurare unicamente la diffusione, o campioni di pelle appena asportati e che evidenziano un'attività metabolica, per misurare contemporaneamente la diffusione e il metabolismo cutaneo. Questi metodi sono utilizzati, in particolare, per confrontare la somministrazione cutanea e transcutanea di varie formulazioni di sostanze chimiche e possono fornire modelli utili per la valutazione dell'assorbimento transcutaneo nell'essere umano.

Tale metodo in vitro potrebbe non essere applicabile in tutte le situazioni e a tutte le classi di sostanze chimiche. Può essere utilizzato per una valutazione qualitativa iniziale della penetrazione cutanea. In alcuni casi potrebbe essere necessario completare detta valutazione con dati *in vivo*. È opportuno consultare il documento orientativo (2) per l'individuazione di altre situazioni in cui l'uso del metodo in vitro può rivelarsi opportuno. I riferimenti bibliografici (3) contengono informazioni dettagliate complementari che risulteranno utili ai fini della scelta del metodo.

Questo documento presenta i principi generali per la misura dell'assorbimento e della diffusione cutanee della sostanza di prova utilizzando pelle asportata. Si possono utilizzare campioni di pelle di molte specie di mammiferi diversi, esseri umani compresi. Le proprietà di permeabilità della pelle sono mantenute dopo l'asportazione dal corpo in quanto la principale barriera di diffusione è lo strato corneo non vitale; non è stato rilevato alcun trasporto transcutaneo attivo di sostanze chimiche. La pelle ha evidenziato la capacità di metabolizzare alcune sostanze chimiche durante l'assorbimento transcutaneo (6), ma questo processo non è limitativo della velocità in termini di dosi effettivamente assorbite, sebbene possa condizionare la natura del materiale che entra nella circolazione sanguigna.

▼B

1.2. DEFINIZIONI

Dose non assorbita: la dose presente nell'acqua di risciacquo dell'epidermide dopo l'esposizione e sulla copertura non occlusiva, ivi comprese le dosi che evaporano dalla pelle durante l'esposizione.

Dosa assorbita (in vitro): massa della sostanza di prova che raggiunge il fluido recettore o la circolazione sistemica entro un determinato periodo.

Dose assorbibile (in vitro): dose presente sulla o nella pelle dopo il lavaggio.

1.3. PRINCIPIO DEL METODO

La sostanza di prova, che può essere radiomarcata, viene applicata sulla superficie di un campione di pelle che separa le due camere di una cella di diffusione. La sostanza chimica viene lasciata sulla pelle per un periodo determinato in condizioni specifiche prima di essere eliminata con un'adeguata procedura di pulitura. Il fluido recettore è campionato in vari momenti durante l'esperimento e analizzato per stabilire la presenza della sostanza di prova e/o di metaboliti.

Qualora vengano utilizzati sistemi metabolicamente attivi, i metaboliti della sostanza di prova possono essere analizzati ricorrendo a metodi adeguati. Alla fine dell'esperimento, la distribuzione della sostanza di prova e i suoi metaboliti sono quantificati, se opportuno.

Nelle condizioni adeguate, descritte nel presente metodo e nel documento orientativo (2), l'assorbimento di una sostanza di prova in un periodo determinato viene misurata analizzando il fluido recettore e il campione di pelle trattato. La sostanza di prova che rimane nella pelle deve essere considerata assorbita, a meno che non si riesca a dimostrare che l'assorbimento può essere determinato anche solo dai valori del fluido recettore. L'analisi degli altri componenti (materiale eliminato dalla pelle mediante risciacquo che rimane negli strati cutanei) consente di procedere a ulteriori valutazioni dei dati, quali l'eliminazione totale della sostanza di prova e la percentuale di recupero.

Al fine di dimostrare le prestazioni e l'affidabilità del sistema nel laboratorio che esegue la prova, sarebbe opportuno disporre dei risultati ottenuti con dei prodotti chimici di riferimento pertinenti, conformemente alla letteratura pubblicata sul metodo in questione. Questo requisito potrebbe essere soddisfatto testando una sostanza di riferimento adeguata (di preferenza una sostanza con affinità per ambienti lipidici simili alla sostanza di prova) contemporaneamente alla sostanza di prova o fornendo dati storici pertinenti per una serie di sostanze di riferimento con affinità per ambienti lipidici diversi (ad esempio, caffeina, acido benzoico e testosterone).

1.4. DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1 **Cella di diffusione**

Una cella di diffusione è costituita da una camera «donatrice» e una camera «recettrice» in mezzo alle quali viene posto il campione di pelle (alla fig. 1 è riportato un modello standard). La cella di diffusione deve avere una buona tenuta intorno alla pelle, consentire un agevole campionamento e un'adeguata miscela della soluzione recettrice in contatto con la faccia inferiore della pelle, permettere un controllo adeguato della temperatura della cella e del suo contenuto. Si possono utilizzare celle di diffusione statiche e a flusso *(flow-through).* Di norma le camere donatrici sono lasciate aperte al momento dell'esposizione ad una dose finita di un preparato di prova. Tuttavia, per applicazioni infinite e in alcuni casi di dosaggi finiti, le camere donatrici possono essere chiuse.

▼B

1.4.2. **Fluido recettore**

Si utilizzerà di preferenza un fluido recettore fisiologicamente adeguato, anche se è consentito l'uso di altri fluidi qualora il loro uso sia giustificato. Occorrerà fornire la composizione esatta del fluido recettore. Occorrerà dimostrare l'adeguata solubilità della sostanza di prova nel fluido recettore in modo che quest'ultimo non ostacoli l'assorbimento. Inoltre, il fluido recettore non deve intaccare l'integrità del campione di pelle. In un sistema a flusso la velocità di flusso non deve ostacolare la diffusione della sostanza di prova nel fluido recettore. In un sistema a cella statica, il fluido dovrebbe essere continuamente agitato e regolarmente campionato. Per lo studio del metabolismo il fluido recettore deve consentire la vitalità del campione di pelle per l'intera durata dell'esperimento.

1.4.3 **Preparati di pelle**

Potranno essere utilizzati campioni di pelle di origine umana e animale. È noto che l'utilizzo di pelle umana è oggetto di considerazioni etiche e soggetto a condizioni nazionali ed internazionali. Di preferenza si utilizzeranno campioni di pelle vitale, ma l'uso di campioni non vitali è consentito a condizione di poter dimostrare l'integrità della pelle. Possono essere utilizzate membrane epidermiche (separate mediante processi enzimatici, termici o chimici) o campioni di pelle di spessore parziale (di solito tra 200 e 400 μm) preparati con un dermatomo. I campioni di pelle a spessore totale sono consentiti, ma dovrebbero essere evitati spessori eccessivi (superiori a circa 1 mm), a meno che non siano specificatamente richiesti per determinare la sostanza chimica di prova negli strati epidermici. Occorre giustificare la scelta della specie, del sito anatomico e della tecnica di preparazione. Sono richiesti dati accettabili risultanti da almeno quattro repliche per preparato di prova.

1.4.4 **Integrità del preparato**

Il campione di pelle deve essere adeguatamente preparato. Eventuali manipolazioni inadeguate possono danneggiare lo strato corneo, pertanto è opportuno verificare l'integrità della pelle preparata. Per lo studio del metabolismo la pelle appena asportata dovrebbe essere utilizzata il più rapidamente possibile e in condizioni che consentano di mantenere l'attività metabolica. A titolo orientativo, la pelle appena asportata dovrebbe essere utilizzata nell'arco di 24 ore, ma il periodo di conservazione consentito potrebbe variare in funzione del sistema enzimatico che interviene nella metabolizzazione e delle temperature di stoccaggio (13). Qualora i campioni di pelle siano stati conservati prima dell'utilizzazione, occorrerebbe dimostrare che la funzione di barriera è stata mantenuta.

1.4.5 **Sostanza di prova**

La sostanza di prova è il prodotto di cui si intende studiare le caratteristiche di penetrazione. Preferibilmente detta sostanza sarà radiomarcata.

1.4.6 **Preparazione della sostanza di prova**

La preparazione della sostanza di prova (ad esempio, materiale puro, diluito o formulato contenente la sostanza di prova applicata sulla pelle) dovrebbe essere identica (o un sostituto adeguato) a quella cui gli esseri umani o le altre specie potenzialmente interessate possono essere esposti. Qualsiasi variazione dalla preparazione d'uso deve essere giustificata.

▼B

1.4.7 **Concentrazioni e formulazioni delle sostanze di prova**

In linea di massima si utilizzano più concentrazioni della sostanza di prova in modo da coprire i valori più elevati della potenziale esposizione umana. Analogamente, si potrebbero *analizzare* una serie di formulazioni tipo.

1.4.8 **Applicazione sulla pelle**

Nelle condizioni normali di esposizione umana alle sostanze chimiche, in linea di massima si riscontrano dosi finite. Sarà pertanto opportuno utilizzare un'applicazione che imiti le condizioni dell'esposizione umana, di solito pari a 1-5 mg/cm^2 di pelle per un solido e 10 $\mu l/cm^2$ per i liquidi. La quantità dovrebbe dipendere dalle condizioni di utilizzo previste, dagli obiettivi del saggio e dalle caratteristiche fisiche del preparato di prova. Ad esempio, le applicazioni sull'epidermide possono essere infinite dove si applicano importanti volumi per unità di superficie.

1.4.9 **Temperatura**

La temperatura condiziona la diffusione passiva delle sostanze chimiche (e pertanto il loro assorbimento cutaneo). La cella di diffusione e la pelle devono essere mantenute ad una temperatura costante vicina alla temperatura normale della pelle (32 ± 1 °C). I vari modelli di cella richiederanno temperature diverse per il bagnomaria e il blocco riscaldante in modo da garantire il rispetto della norma fisiologica del recettore/della pelle. L'umidità sarà preferibilmente compresa tra 30 e 70 %.

1.4.10 **Durata dell'esposizione e del campionamento**

Il campione di pelle può essere esposto al preparato di prova per l'intera durata del saggio o per periodi più brevi (ad esempio per simulare un tipo specifico di esposizione). Il lavaggio della pelle per eliminare l'eccesso di sostanza di prova dove essere eseguito con un agente di pulizia adeguato e l'acqua di risciacquo deve essere raccolta per essere analizzata. La procedura di eliminazione del preparato di prova dipenderà delle condizioni di uso previste e deve essere giustificata. Di norma è necessario un periodo di campionamento di 24 ore per ottenere l'adeguata caratterizzazione del profilo di assorbimento. Dal momento che l'integrità della pelle può cominciare a deteriorarsi dopo 24 ore, i periodi di campionamento non dovrebbero mai superare le 24 ore. Per le sostanze di prova che penetrano rapidamente nella pelle, il problema non si pone, ma per quelle che penetrano più lentamente possono essere necessari tempi più lunghi. La frequenza di campionamento del fluido recettore dovrebbe consentire di procedere alla rappresentazione grafica del profilo di assorbimento della sostanza di prova.

1.4.11 **Procedure finali**

Tutti i componenti del sistema di prova devono essere analizzati ed occorre determinare il tasso di recupero. Ciò riguarda la camera donatrice, l'acqua di risciacquo dell'epidermide, il preparato di pelle, il fluido recettore o la camera recettrice. In alcuni casi la pelle può essere frazionata nell'area esposta della pelle e nell'area della pelle sotto il bordo della cella e in frazioni di strato corneo, epidermide e derma per eseguire analisi separate.

1.4.12 **Analisi**

In tutti gli studi si dovrebbe ottenere un tasso di recupero sufficiente (l'obiettivo deve essere una media di 100 ± 10 % della radioattività, gli eventuali scartamenti da questi valori devono essere giustificati). La quantità di sostanza di prova nel fluido recettore, nel preparato di pelle, nelle acque di lavaggio dell'epidermide e nell'acqua di risciacquo dell'apparecchio devono essere analizzate con una tecnica adeguata.

▼B

2. **DATI**

Occorre fornire l'analisi del fluido recettore, la distribuzione della sostanza di prova nel sistema e il profilo d'assorbimento nel corso del tempo. In condizioni di esposizione a dosi finite, è necessario calcolare la quantità eliminata dalla pelle con il risciacquo, la quantità assimilata dalla pelle (e dai vari strati cutanei, se sono analizzati) e la quantità presente nel fluido recettore (tasso, quantità o percentuale della dose applicata). L'assorbimento cutaneo può a volte essere espresso unicamente utilizzando i dati relativi al fluido recettore. Tuttavia, quando la sostanza di prova rimane nella pelle alla fine dello studio, può essere necessario includerla nella quantità totale assorbita [cfr. paragrafo 66 nel riferimento bibliografico (3)]. In condizioni di esposizione a dosi infinite, i dati possono consentire di calcolare una costante di permeabilità (Kp). In tal caso, la percentuale assorbita è irrilevante.

3. **RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL SAGGIO**

3.1. RAPPORTO DI PROVA

Il rapporto di prova deve contenere i requisiti stabiliti nel protocollo, in particolare la giustificazione del sistema utilizzato, nonché le seguenti informazioni:

Sostanza di prova:

— natura fisica, proprietà fisicochimiche (almeno il peso molecolare e il coefficiente di ripartizione - log P_{OW}), purezza (purezza radiochimica);

— dati di identificazione (ad es. numero del lotto);

— solubilità nel fluido recettore.

Preparazione della sostanza di prova:

— formulazione e giustificazione dell'utilizzo;

— omogeneità.

Condizioni di prova:

— origini e sito della pelle, metodo di preparazione, condizioni di stoccaggio prima dell'uso, eventuali pretrattamenti (pulizia, trattamenti antibiotici ecc.), misure dell'integrità della pelle, stato metabolico, giustificazione dell'uso;

— modello di cella, composizione del fluido recettore, velocità di flusso del fluido recettore o intervalli e procedure di campionamento;

— informazioni sull'applicazione del preparato di prova e quantificazione della dose applicata;

— durata dell'esposizione;

— informazioni sull'eliminazione del preparato di prova dalla pelle (ad es. risciacquo della pelle);

— informazioni sull'analisi della pelle e le tecniche di frazionamento eventualmente utilizzate per dimostrare la distribuzione cutanea;

▼B

— procedure di lavaggio della cella e dell'apparecchiatura;

— metodi di saggio, tecniche di estrazione, limiti di rilevazione e validazione del metodo analitico.

Risultati:

— recuperi totali del saggio (dose applicata = liquido di lavaggio della pelle + pelle + fluido recettore + liquido di lavaggio della cella);

— tabella dei tassi di recupero in ciascun compartimento della cella;

— profilo di assorbimento;

— tabella dei valori di assorbimento (espressi sotto forma di tasso, quantità o percentuale).

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4. **BIBLIOGRAFIA**

1. Metodo B.44. Assorbimento cutaneo: metodo *in vivo*.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OCSE, Parigi.

3. OCSE (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OCSE, Parigi.

4. Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5. Bronaugh RL and Collier, SW.(1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications,* RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pagg. 237-241.

6. Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications.* CRC Press, Boca Raton.

7. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monografia n. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Bruxelles.

8. Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, 191-205.

9. Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

10. Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et al.* (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

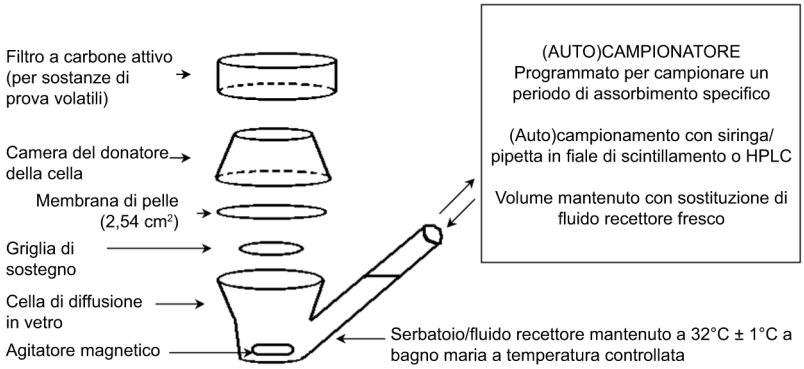
11. Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basilea.

12. Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13. Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356-365.

Figura 1

Esempio di un modello tipo di cella di diffusione statica concepita per studiare l'assorbimento transcutaneo *in vitro*



▼M8

B.46. **IRRITAZIONE CUTANEA IN VITRO: METODO DI PROVA SU UN MODELLO DI EPIDERMIDE UMANA RICOSTITUITA**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼M7

B.47. **METODO DI PROVA DELL'OPACITÀ E DELLA PERMEABILITÀ DELLA CORNEA NEI BOVINI PER L'IDENTIFICAZIONE DI I) SOSTANZE CHIMICHE CHE INDUCONO GRAVI LESIONI OCULARI E II) SOSTANZE CHIMICHE CHE NON RICHIEDONO CLASSIFICAZIONE PER IRRITAZIONE OCULARE O GRAVI LESIONI OCULARI**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼M7

B.48. **METODO DI PROVA SULL'OCCHIO ISOLATO DEI POLLI (*ISOLATED CHICKEN EYE* — ICE) PER L'IDENTIFICAZIONE DI I) SOSTANZE CHIMICHE CHE INDUCONO GRAVI LESIONI OCULARI E II) SOSTANZE CHIMICHE CHE NON RICHIEDONO CLASSIFICAZIONE PER IRRITAZIONE OCULARE O GRAVI LESIONI OCULARI**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼**M7**

B.49. **PROVA DEL MICRONUCLEO IN VITRO CON CELLULE DI MAMMIFERO**

▼**M10**

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼M3

B.50. **SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA: LOCAL LYMPH NODE ASSAY: DA**

INTRODUZIONE

1. Le linee guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche (OCSE Guidelines for the Testing of Chemicals) e i metodi di prova dell'UE vengono periodicamente rivisti alla luce dei progressi scientifici, delle mutevoli esigenze in materia di regolamentazione, e di considerazioni relative al benessere degli animali. Il primo metodo di prova (TM) (B.42) per la determinazione dell'irritazione cutanea nel topo, denominato Local Lymph Node Assay (LLNA; OCSE Test Guideline 429), è stato rivisto (1). Sono state pubblicate informazioni dettagliate sulla validazione dell'LLNA nonché una revisione delle attività a queste associate (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Nell'LLNA si utilizzano timidina o iodina marcate con traccianti radioisotopici per misurare la proliferazione dei linfociti; di conseguenza, quando l'acquisizione, l'impiego o lo smaltimento della radioattività risultano problematici, il ricorso al saggio è limitato. L'LLNA: DA (sviluppato da Daicel Chemical Industries, Ltd.) è una variante non radioattiva del metodo LLNA, che quantifica il contenuto di adenosina trifosfato (ATP) tramite bio-luminescenza utilizzandolo come indicatore della proliferazione linfocitaria. Il saggio LLNA: DA è stato convalidato, rivisto e raccomandato da un gruppo internazionale di esperti scientifici indipendenti, che lo considerano utile per l'individuazione di sostanze chimiche che provocano o non provocano sensibilizzazione cutanea, con alcuni limiti (10) (11) (12) (13). Il presente metodo di prova è stato concepito per valutare il potenziale di sensibilizzazione cutanea delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) negli animali. Il capitolo B.6 del presente allegato e la linea guida dell'OCSE «Test Guideline 406» utilizzano saggi sui porcellini d'India, segnatamente il saggio di massimizzazione sui porcellini d'India e il saggio di Buehler (14). L'LLNA (capitolo B.42 del presente allegato; OCSE Test Guideline 429) e le sue due varianti non radioattive, LLNA: DA (capitolo B.50 del presente allegato; OCSE Test Guideline 442 A) e LLNA: BrdU-ELISA (capitolo B.51 del presente allegato; OCSE Test Guideline 442 B), offrono tutti un vantaggio rispetto ai saggi sui porcellini d'India in B.6 e OCSE Test Guideline 406 (14) in termini di riduzione e perfezionamento dell'utilizzo di animali.

2. Simile all'LLNA, l'LLNA: DA studia la fase di induzione della sensibilizzazione cutanea e fornisce dati quantitativi adeguati per una valutazione dose-risposta. Inoltre, la capacità del saggio di individuare sensibilizzanti cutanei senza la necessità di ricorrere a marcatori radioattivi per il DNA elimina il potenziale di esposizione professionale alla radioattività e le problematiche correlate allo smaltimento dei rifiuti. Ciò a sua volta può giustificare un accresciuto impiego dei topi per l'individuazione dei sensibilizzanti cutanei, che potrebbe ridurre ulteriormente l'uso dei porcellini d'India per testare il potenziale di sensibilizzazione cutanea (B.6; OCSE Test Guideline 406) (14).

DEFINIZIONI

3. Le definizioni usate figurano nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

4. Il saggio LLNA: DA è una variante del metodo LLNA da usarsi per identificare le potenziali sostanze chimiche che provocano sensibilizzazione cutanea, con alcuni limiti specifici. Ciò non significa necessariamente che l'LLNA: DA vada usato in tutti i casi in sostituzione del metodo LLNA o dei test sui porcellini d'India (B.6; OCSE Test Guideline 406) (14), ma piuttosto che il saggio ha gli stessi meriti e può essere utilizzato in alternativa, poiché i risultati positivi e negativi ottenuti con questo metodo non richiedono generalmente un'ulteriore conferma (10) (11). Prima di effettuare

▼M3

lo studio, il laboratorio che esegue il test deve consultare tutte le informazioni disponibili sulla sostanza di prova, tra cui l'identità e la struttura chimica, le proprietà chimiche-fisiche, i risultati di eventuali altri test di tossicità in vitro o in vivo eseguiti sulla sostanza e i dati tossicologici su sostanze strutturalmente affini. Queste informazioni devono essere considerate per stabilire l'adeguatezza del saggio LLNA: DA per la sostanza in questione [data l'incompatibilità di talune limitate tipologie di sostanze chimiche LLNA: DA (cfr. il punto 5)] e servono a scegliere la dose.

5. L'LLNA: DA è un metodo in vivo e, di conseguenza, non elimina l'impiego di animali nella valutazione dell'attività allergizzante da contatto. Essa ha però il potenziale di ridurre il numero di animali necessari a tale scopo rispetto ai saggi sui porcellini d'India (B.6; OCSE Test Guideline 406) (14). Inoltre, l'LLNA: DA rappresenta un significativo miglioramento (minor sofferenza e dolore fisico) del modo in cui vengono usati gli animali per gli studi sull'allergia da contatto perché, diversamente dal metodo B.6 e dalla linea guida OCSE Test Guideline 406, l'LLNA: DA non richiede la stimolazione di reazioni di ipersensibilità cutanea indotte da provocazione. Nonostante i vantaggi dell'LLNA: DA rispetto al metodo B.6 e alla linea guida OCSE Test Guideline 406 (14), occorre riconoscere che esistono alcune limitazioni che possono rendere necessario l'impiego del metodo B.6 o della linea guida OCSE Test Guideline 406 [ad esempio, i test con alcuni metalli, risposte falsi positivi con alcuni irritanti cutanei (tra cui alcune sostanze della categoria dei tensioattivi) (6) (1 e capitolo B.42 del presente allegato), la solubilità della sostanza di prova]. Inoltre, le classi di sostanze chimiche o le sostanze contenenti gruppi funzionali che hanno dimostrato di agire da potenziali fattori di confondimento (16) possono richiedere l'uso dei saggi sui porcellini d'India (B.6; OCSE Test Guideline 406) (14). Si raccomanda di applicare anche all'LLNA: DA (10) i limiti che sono stati individuati per l'LLNA (1, e capitolo B.42 del presente allegato). Inoltre, l'uso del metodo LLNA: DA potrebbe non essere appropriato per la sperimentazione di sostanze che interferiscono con i livelli di ATP (ad esempio, sostanze che funzionano come inibitori degli ATP) o che non permettono un'accurata misurazione degli ATP intracellulari (ad esempio, presenza di enzimi che degradano gli ATP, presenza di ATP extracellulari nel linfonodo). A parte tali limiti già rilevati, l'LLNA: DA dovrebbe essere adatto per la sperimentazione di qualsiasi sostanza chimica, a meno che tale sostanza non possieda delle proprietà che possono interferire con l'accuratezza del saggio. Inoltre, non andrebbe esclusa la possibilità di produrre risultati positivi borderline nel caso in cui si ottengano valori per l'indice di stimolazione (SI) compresi tra 1,8 e 2,5 (cfr. i punti 31-32). Tale considerazione è basata sulla banca dati di validazione di 44 sostanze e l'uso di un SI $\geq$ 1,8 (cfr. il punto 6) nelle quali l'LLNA: DA ha correttamente individuato tutti i 32 sensibilizzanti dell'LLNA, ma ha erroneamente identificato tre delle 12 sostanze non sensibilizzanti dell'LLNA con valori SI compresi tra 1,8 e 2,5 (risultato borderline positivo) (10). Tuttavia, poiché lo stesso insieme di dati è stato usato per definire i valori SI e per calcolare le proprietà predittive del test, i risultati menzionati potrebbero essere una stima in eccesso delle reali proprietà predittive.

PRINCIPIO DEL METODO

6. Il principio fondamentale che sta alla base dell'LLNA: DA è che i sensibilizzanti inducono una proliferazione di linfociti nel linfonodo responsabile del drenaggio della zona di applicazione della sostanza chimica. Tale proliferazione è proporzionale alla dose e alla potenza dell'allergene applicato e costituisce un semplice mezzo per ottenere una misurazione quantitativa della sensibilizzazione. Tale proliferazione è misurata confrontando la proliferazione media in ogni gruppo sperimentale con la proliferazione media nei controlli trattati con veicolo (VC). Occorre determinare il rapporto fra la proliferazione media nel gruppo trattato e quella del gruppo parallelo trattato

▼M3

con veicolo, definito «Indice di Stimolazione» (SI), che deve essere ≥ 1,8 prima che una sostanza sperimentale possa ulteriormente valutata come potenziale sensibilizzante cutaneo. Le procedure qui descritte si basano sulla misurazione del contenuto di ATP tramite bioluminescenza (tecnica nota per il conteggio delle cellule vive) (17) per rilevare un aumento del numero di cellule in fase di proliferazione nei linfonodi auricolari responsabili del drenaggio (18) (19). Il metodo della bioluminescenza utilizza l'enzima luciferasi per catalizzare la formazione di luce da ATP e luciferina in base alla seguente reazione:

$$ATP + Luciferina + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Ossiluciferina + AMP + PP_i + CO_2 + Luce$$

L'intensità della luce emessa è linearmente correlata alla concentrazione di ATP ed è misurata mediante un luminometro. Il saggio luciferina-luciferasi è un metodo sensibile per la quantificazione degli ATP usato in un'ampia varietà di applicazioni (20).

DESCRIZIONE DEL SAGGIO

Selezione delle specie animali

7. La specie di elezione per questo saggio è il topo. Gli studi di validazione per l'LLNA: DA sono stati condotti esclusivamente con il ceppo CBA/J, che pertanto è considerato il ceppo da preferire (12) (13). Vanno usate femmine di topo, giovani adulte, nullipare e non gravide. All'inizio dello studio, gli animali devono avere un'età compresa fra 8 e 12 settimane e la variazione ponderale degli animali deve essere minima e non superare il 20 % del peso medio. In alternativa, è possibile usare altri ceppi ed esemplari di sesso maschile quando vengano prodotti dati sufficienti a dimostrare che nella risposta LLNA: DA non esistono differenze significative per il ceppo e/o il genere.

Condizioni di alloggio e alimentazione

8. I topi devono essere sistemati in gruppi (21), a meno che non venga fornita una giustificazione scientifica adeguata per la sistemazione dei topi in gabbie singole. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). Sebbene l'umidità relativa debba raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti, occorre puntare a un valore del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 ore d'oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata di acqua potabile.

Preparazione degli animali

9. Gli animali vanno selezionati in maniera randomizzata, marcati per consentire l'identificazione individuale (ma non mediante marchi per orecchio) e tenuti nelle loro gabbie per almeno cinque giorni prima del'inizio del dosaggio, per permetterne l'acclimatazione alle condizioni di laboratorio. Prima dell'inizio del trattamento, tutti gli animali vanno esaminati per accertarsi che non presentino lesioni cutanee visibili.

Preparazione delle soluzioni

10. Le sostanze solide devono essere poste in soluzione o in sospensione in solventi/veicolo e, se necessario, diluite prima dell'applicazione su un orecchio del topo. Le sostanze liquide possono essere applicate direttamente o diluite prima del dosaggio. Le sostanze chimiche insolubili, come quelle solitamente presenti nei dispositivi medici, dovrebbero essere sottoposte a un'esagerata procedura di estrazione in un solvente adeguato per individuare tutti i componenti estraibili per la sperimentazione prima dell'applicazione a un orecchio del topo. Le sostanze di prova devono essere preparate quotidianamente, salvo qualora siano disponibili dati sulla stabilità che dimostrino che la conservazione è accettabile.

▼M3

Controllo dell'affidabilità

11. Si utilizzano sostanze chimiche per i controlli positivi (PC) per dimostrare che il saggio è stato eseguito in modo adeguato, rispondendo con una sensibilità appropriata e riproducibile a una sostanza sperimentale sensibilizzante per la quale l'entità della risposta SIA ben caratterizzata. Si raccomanda l'inclusione di una sostanza di controllo parallela, che dimostri la competenza del laboratorio nel condurre il saggio con successo e che consenta di valutare la riproducibilità e la compatibilità all'interno del laboratorio e tra laboratori diversi. Alcune autorità di regolamentazione richiedono inoltre l'uso di un controllo positivo per ciascuno studio; si invitano pertanto gli utilizzatori a consultare le autorità competenti prima di eseguire l'LLNA: DA. Di conseguenza, è auspicabile l'uso routinario di una sostanza di controllo parallela onde evitare la necessità di condurre ulteriori esperimenti su animali per soddisfare obblighi che potrebbero emergere dall'impiego periodico di un controllo positivo (cfr. il punto 12). Il controllo positivo dovrebbe produrre una risposta positiva all'LLNA: DA a un livello di esposizione che si ritiene provochi un aumento dell'indice di stimolazione SI $\geq$ 1,8 rispetto al gruppo di controllo negativo (NC). La dose per il controllo positivo va scelta in modo che non provochi eccessiva irritazione cutanea o tossicità sistemica e che l'induzione sia riproducibile m non eccessiva (ad esempio, un SI > 10 sarebbe eccessivo). Le sostanze di elezione sono un 25 % di esilcinnamaldeide (CAS 101-86-0) e un 25 % di eugenolo (CAS 97-53-0,) in acetone: olio d'oliva (4:1, v/v). Possono verificarsi occasioni in cui, con adeguata giustificazione, è possibile usare altre sostanze di controllo che rispondono ai criteri di cui sopra.

12. Se da un lato si raccomanda l'inclusione di un gruppo di controllo positivo, possono esservi situazioni in cui l'esame periodico (ossia a intervalli $\leq$ 6 mesi) della sostanza di controllo può essere appropriato nel caso di laboratori che effettuano l'LLNA: DA regolarmente (ossia con una frequenza non inferiore a una volta al mese) e che hanno a disposizione una banca dati con informazioni storiche consolidate sui controlli positivi, che dimostra la capacità del laboratorio di ottenere risultati accurati e riproducibili con le sostanze di controllo. Un'adeguata competenza nella conduzione dell'LLNA: DA può essere dimostrata senza difficoltà producendo risultati positivi coerenti con i controlli positivi in almeno 10 saggi indipendenti effettuati in un periodo di tempo ragionevole (ossia meno di un anno).

13. Un gruppo di controllo positivo parallelo deve essere incluso ogni volta che viene introdotta una modifica procedurale nell'LLNA: DA (ad esempio, una modifica del personale qualificato, dei materiali e/o dei reagenti usati per il metodo di prova, delle attrezzature impiegate per il metodo di prova, dell'origine degli animali sperimentali), e tali modifiche devono essere documentate nelle relazioni del laboratorio. Nel valutare la necessità di creare una nuova banca dati storica per documentare la coerenza dei risultati sui controlli positivi occorre prendere in considerazione le conseguenze che tali modifiche producono sull'adeguatezza della banca dati pregressa.

14. Gli esaminatori devono essere consapevoli del fatto che la decisione di condurre uno studio sui controlli positivi con cadenza periodica anziché in parallelo ha ripercussioni sull'adeguatezza e sull'accettabilità dei risultati negativi ottenuti senza un controllo positivo parallelo nell'intervallo compreso tra ciascuno studio periodico sul controllo positivo. Per esempio, se in uno studio periodico sui controlli positivi si ottiene un risultato falso negativo, i risultati negativi ottenuti sulle sostanze sperimentali nell'intervallo tra l'ultimo studio periodico accettabile e lo studio periodico sul controllo positivo ritenuto inaccettabile possono essere messi in dubbio. Le implicazioni di questi risultati devono essere considerate con estrema attenzione al momento di stabilire se includere controlli positivi paralleli o se condurre soltanto studi periodici sui controlli positivi. Si deve inoltre valutare la possibilità di utilizzare un numero di animali inferiore nel gruppo di controlli positivi paralleli, qualora ciò sia scientificamente giustificato e se il laboratorio dimostra, sulla scorta di dati storici specifici per il laboratorio, che è possibile ricorrere a un numero di topi inferiore (22).

▼M3

15. Sebbene la sostanza di controllo positivo vada sottoposta a saggi nel veicolo che è noto per la sua capacità di provocare una risposta coerente (ad esempio, acetone: olio d'oliva; 4:1, v/v), è possibile che si verifichino alcune situazioni normative nelle quali sarà necessario eseguire il saggio anche in un veicolo non standard (formulazione clinicamente/chimicamente pertinente) (23). Se il controllo positivo parallelo è testato in un veicolo diverso rispetto alla sostanza in esame, si deve inserire per il controllo positivo parallelo un VC distinto.

16. Nei casi in cui si valutano sostanze sperimentali di una specifica classe chimica o nell'ambito di una specifica gamma di risposte, la presenza di sostanze di riferimento può essere utile anche per dimostrare che il metodo di prova funziona correttamente per rilevare il potenziale di irritazione cutanea di queste tipologie di sostanze. Le sostanze di riferimento appropriate devono avere le seguenti proprietà:

— somiglianza strutturale e funzionale con la classe della sostanza in esame;

— caratteristiche fisiche/chimiche note;

— dati di supporto provenienti dall'LLNA: DA;

— dati di supporto provenienti da altri modelli animali e/o dall'uomo.

PROCEDURA DI PROVA

Numero di animali e livelli di dose

17. Ogni gruppo di saggi comprende almeno quattro animali, sui quali si saggiano almeno tre concentrazioni della sostanza sperimentale, più un gruppo di controllo negativo parallelo trattato solo con il veicolo della sostanza sperimentale e un controllo positivo (parallelo o recente, secondo la politica di laboratorio adottata in considerazione dei punti 11-15). Si deve valutare l'opportunità di testare dosi multiple del controllo positivo, soprattutto se quest'ultimo è sottoposto ad esame con modalità intermittente. Salvo il trattamento con la sostanza in esame, gli animali dei gruppi di controllo vanno manipolati esattamente come quelli dei gruppi sperimentali.

18. La selezione della dose e del veicolo è basata sulle raccomandazioni contenute nelle voci bibliografiche (2) e (24). Le dosi consecutive si selezionano normalmente da una concentrazione appropriata tra le seguenti: 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2.5 %, 1 %, 0,5 % ecc. La selezione della concentrazione usata va accompagnata da adeguate motivazioni scientifiche. Ove disponibili, occorre tener conto dei dati tossicologici esistenti (ad esempio, tossicità acuta e irritazione cutanea) e delle informazioni strutturali e fisico-chimiche sulla sostanza sperimentale d'interesse (e/o sulle sostanze strutturalmente affini), nel selezionare le tre concentrazioni consecutive in modo che la concentrazione più elevata massimizzi l'esposizione, evitando al contempo la tossicità sistemica e/o l'eccessiva irritazione cutanea locale (24) (25). In assenza di tali informazioni può essere necessario effettuare un saggio iniziale preliminare (cfr. i punti 21-24).

19. Il veicolo non deve interferire o condizionare il risultato del saggio e va selezionato con l'obiettivo di massimizzare la solubilità per ottenere la concentrazione più elevata possibile, producendo al contempo una soluzione/sospensione adatta all'applicazione della sostanza di prova. I veicoli raccomandati sono acetone: olio d'oliva (4:1 v/v), N,N-dimetilformammide, metiletilcheton, glicole propilenico e dimetilsulfossido (6), ma è possibile utilizzarne anche altri, fornendo una sufficiente motivazione scientifica. In alcune situazioni può rendersi necessario l'uso di un solvente clinicamente pertinente o la formulazione nella quale la sostanza è posta in commercio, come controllo ulteriore. Occorre prestare particolare cura per assicurare che i materiali idrofili vengano incorporati in un sistema veicolare che inumidisce la pelle e non scorre via immediatamente, includendo solventi adeguati (ad esempio, 1 % Pluronic® L92). Vanno pertanto evitati i veicoli completamente acquosi.

▼M3

20. L'elaborazione dei linfonodi da singoli topi consente di valutare la variabilità interanimale e permette di effettuare un confronto statistico della differenza tra le misurazioni raccolte con la sostanza sperimentale e quelle con il gruppo VC (cfr. il punto 33). Inoltre, è possibile valutare la possibilità di ridurre il numero di topi nel gruppo di controllo positivo soltanto quando si raccolgono risultati individuali per ciascun animale (22). Tra l'altro, alcune autorità di regolamentazione impongono l'obbligo di raccogliere risultati individuali per ciascun animale. La regolare raccolta di dati individuali per singolo animale offre il vantaggio, dal punto di vista del benessere degli animali, di evitare di replicare i test, il che sarebbe invece indispensabile se i risultati sulla sostanza sperimentale raccolti originariamente con una modalità (ad esempio, raccogliendo dati aggregati) fossero successivamente considerati dalle autorità di regolamentazione assieme ad altri requisiti (ad esempio, dati individuali).

Saggio preliminare

21. In assenza di informazioni per determinare la dose più elevata da testare (cfr. il punto 18), è necessario eseguire un saggio preliminare, che consenta di definire il livello di doser appropriato per l'LLNA: DA. Scopo del saggio preliminare è fornire informazioni orientative per la selezione della dose massima di utilizzo nel principale studio LLNA: DA, nel caso in cui non siano disponibili informazioni sulla concentrazione che induce tossicità sistemica (cfr. il punto 24)/o eccessiva irritazione cutanea locale (cfr. il punto 23) La dose massima utilizzata nel saggio deve corrispondere al 100 % della sostanza sperimentale per i liquidi o la concentrazione massima possibile per i solidi o le sospensioni.

22. Il saggio preliminare è condotto in condizioni identiche allo studio LLNA: DA, con la differenza che la proliferazione dei linfonodi non è valutata e che può essere utilizzato un numero inferiore di animali per gruppi di saggi. Si suggerisce di ricorrere a uno o due animali per gruppo di saggi. Tutti i topi sono sottoposti quotidianamente a osservazioni per la ricerca di eventuali segni clinici di tossicità sistemica o irritazione locale nel sito di applicazione. Il peso è registrato prima del saggio e prima della sua conclusione (giorno 8). Entrambe le orecchie dei topi sono esaminate per individuare segni di eritema e l'esito dell'ispezione è registrato sulla scorta della tabella 1 (25). Lo spessore dell'orecchio si misura con un apposito misuratore (ad esempio, un micrometro digitale o un micrometro Peacock Dial) il giorno 1 (prima della somministrazione della dose), il giorno 3 (circa 48 ore dopo la prima somministrazione), il giorno 7 (24 ore prima della conclusione dello studio) e il giorno 8. Inoltre, il giorno 8 lo spessore dell'orecchio potrebbe essere calcolato misurando il peso di parti di orecchio prelevate con biopsia eseguita dopo la morte dell'animale per eutanasia. Un'irritazione cutanea eccessiva a livello locale è indicata da un punteggio ≥ 3 e/o da un aumento dello spessore dell'orecchio ≥ 25 % in un qualsiasi giorno di misurazione (26) (27). La dose più elevata selezionata per lo studio LLNA: DA principale sarà la dose immediatamente inferiore nella serie di concentrazioni utilizzate per il saggio preliminare (cfr. il punto 18) che non induce tossicità sistemica e/o irritazione cutanea eccessiva a livello locale.

Tabella 1

Scala di valutazione dell'eritema

Osservazioni	Punteggio
Nessun eritema	0
Eritema di lieve entità (appena visibile)	1
Eritema ben visibile	2

▼M3

Osservazioni	Punteggio
Eritema da moderato a grave	3
Eritema grave (rosso barbabietola) con formazione di escare che impedisce di valutare l'entità della lesione	4

23. Oltre all'aumento del 25 % dello spessore dell'orecchio (26) (27), per individuare le sostanze irritanti nell'LLNA è stato anche utilizzato un aumento statisticamente significativo dello spessore dell'orecchio nei topi trattati rispetto ai controlli (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Tuttavia, se è vero che possono verificarsi aumenti statisticamente significativi dello spessore dell'orecchio, altrettanto certo è che quando sono inferiori al 25 % non sono stati associati, nello specifico, a un'eccessiva irritazione (30) (31) (32) (33) (34).

24. Le seguenti osservazioni cliniche possono indicare tossicità sistemica (35) se usate nell'ambito di una valutazione integrata e, pertanto, possono suggerire la dose massima da utilizzare nell'LLNA: DA principale: alterazioni della funzione del sistema nervoso (ad esempio, piloerezione, atassia, tremori e convulsioni); variazioni del comportamento (ad esempio, aggressività, cambiamenti delle attività di toelettatura, marcato cambiamento nel livello di attività); variazioni dei pattern respiratori (ossia variazioni della frequenza e dell'intensità della respirazione come dispnea, boccheggiamento e rantoli) e variazioni nel consumo di cibo e acqua. Inoltre, nella valutazione vanno presi in considerazione segni di letargia e/o assenza di reattività e qualsiasi altro segno di sofferenza e dolore fisico non lieve o momentaneo, o una riduzione ponderale > 5 % dal giorno 1 al giorno 8, oltre che la mortalità. Gli animali moribondi o chiaramente sofferenti o recanti segni gravi e persistenti di sofferenza devono essere sottoposti a eutanasia (36).

Protocollo sperimentale dello studio principale

25. Il protocollo sperimentale del saggio è il seguente:

— *Giorno 1:* Identificare e registrare il peso di ciascun animale singolarmente e riportare eventuali elementi emersi dall'osservazione clinica. Applicare una soluzione acquosa all'1 % di laurilsolfato di sodio (SLS) sulla parte posteriore di entrambe le orecchie utilizzando un pennello intinto nella soluzione SLS per coprire la parte di orecchio interessata con quattro-cinque pennellate. Un'ora dopo il trattamento con SLS, applicare 25 µL della diluizione appropriata della sostanza sperimentale, del solo veicolo o del controllo positivo (parallelo o recente, a seconda della politica di laboratorio adottata in considerazione dei punti 11-15), sulla parte posteriore di entrambe le orecchie.

— *Giorni 2, 3 e 7:* Ripetere il trattamento con soluzione acquosa all'1 % di SLS e la procedura di applicazione eseguita il giorno 1.

— *Giorni 4, 5 e 6:* Nessun trattamento.

— *Giorno 8:* Registrare il peso di ciascun animale ed eventuali elementi emersi dall'osservazione clinica. Circa 24-30 ore dopo l'inizio dell'applicazione il giorno 7, sottoporre gli animali a eutanasia. Asportare i linfonodi auricolari drenanti di entrambe le orecchie e porli in soluzione salina tampone fosfato (PBS) per ciascun animale separatamente. I particolari e i diagrammi relativi all'identificazione e alla dissezione dei linfonodi si trovano nella bibliografia (22). Per un ulteriore controllo della risposta cutanea locale nello studio principale possono essere inclusi nel protocollo altri parametri come il punteggio relativo all'eritema o le misurazioni dello spessore dell'orecchio (ottenute utilizzando un micrometro o mediante ear punch weight determinations all'autopsia.

▼M3

Preparazione delle sospensioni cellulari

26. Da ciascun topo si prepara una singola sospensione di cellule linfonodali asportate bilateralmente inserendo i linfonodi tra due vetrini ed esercitando una leggera pressione per schiacciare i linfonodi. Dopo essersi accertati di aver ottenuto un sottile strato di tessuto, aprire i vetrini. Porre il tessuto rimasto sui due vetrini in sospensione in una soluzione salina tampone fosfato (PBS): reggere un angolo di ciascun vetrino sopra la piastra di Petri e sciacquare con la soluzione, raschiando il tessuto dal vetrino con apposito raschietto. Poiché i linfonodi dei controlli negativi sono piccoli, è importante effettuare queste operazioni con attenzione per evitare di provocare effetti artificiali sui valori dell'indice di stimolazione. Per sciacquare i due vetrini è necessario un volume complessivo di soluzione PBS pari a 1 mL. La sospensione di linfonodi nella piastra di Petri dev'essere delicatamente omogeneizzata con il raschietto. Raccogliere 20 µL della sospensione con una micropipetta, facendo attenzione a non prelevare la membrana visibile a occhio nudo, e successivamente miscelare il tessuto prelevato con 1,98 mL di soluzione PBS fino a ottenere un campione di 2 mL. Preparare un secondo campione di 2 mL seguendo la medesima procedura, in modo da predisporre due campioni per ciascun animale.

Determinazione della proliferazione delle cellule (misurazione del contenuto di ATP nei linfociti)

27. Gli aumenti del contenuto di ATP nei linfonodi si misurano con il metodo luciferina/luciferasi avvalendosi di un kit ATP, che misura la bioluminescenza nelle unità di luminescenza relative (RLU). La durata del saggio, dal momento della soppressione dell'animale alla misurazione del contenuto di ATP per ciascun animale, dev'essere mantenuta uniforme, entro un arco temporale di circa 30 minuti, poiché si ritiene che il contenuto di ATP diminuisca gradualmente nel tempo dopo la morte dell'animale (12). Pertanto, la serie di procedure compresa tra l'escissione dei linfonodi auricolari e la misurazione degli ATP dev'essere ultimata entro 20 minuti, secondo il calendario prefissato che è lo stesso per ciascun animale. La luminescenza ATP si misura in ciascun campione di 2 mL in modo da raccogliere per ogni animale un totale di due misure ATP. In questo modo si determina la luminescenza ATP media, che verrà usata per i successivi calcoli (cfr. il punto 30).

OSSERVAZIONI

Osservazioni cliniche

28. Ogni topo va osservato attentamente almeno una volta al giorno per individuare eventuali segni clinici di irritazione locale nel punto di applicazione o di tossicità sistemica. Tutte le osservazioni vanno registrate sistematicamente e riportate singolarmente per ciascun topo. I piani di controllo devono includere criteri per individuare prontamente gli esemplari che esibiscono tossicità sistemica, eccessiva irritazione cutanea a livello locale o corrosione cutanea per eutanasia (36).

Peso corporeo

29. Come illustrato al punto 25, all'inizio del saggio e al momento della soppressione programmata degli animali per eutanasia occorre individuare il peso dei singoli esemplari.

CALCOLO DEI RISULTATI

30. I risultati vengono espressi, per ciascun gruppo di trattamento, mediante l'indice di stimolazione (SI) medio. L'indice di stimolazione si ottiene dividendo i valori medi dell'RLU per topo calcolati per ogni gruppo di trattamento, compreso il controllo positivo, per la media dell'RLU per topo per il gruppo di controllo trattato con veicolo/solvente. Quindi l'SI medio per i controlli trattati con veicolo è uno.

▼M3

31. Il processo decisionale rispetto a una risposta positiva prevede un indice di stimolazione SI ≥ 1,8 (10). Tuttavia, per determinare se un risultato borderline (ossia un valore SI compreso tra 1,8 e 2,5) è dichiarato positivo (2) (3) (37), possono anche essere utilizzati la potenza del rapporto dose-risposta, la significatività statistica e la coerenza del solvente/veicolo oltre che le risposte dei controlli positivi.

32. Nel caso di una risposta positiva borderline con un valore SI compreso tra 1,8 e 2,5, per confermare che tali risultati sono positivi gli utilizzatori potrebbero voler prendere in considerazione informazioni aggiuntive come il rapporto dose-risposta, le prove di tossicità sistemica o irritazione eccessiva e, se del caso, la significatività statistica oltre che i valori SI (10). Inoltre, è necessario tener conto di diverse proprietà della sostanza sperimentale, in particolare se ha un rapporto strutturale con noti sensibilizzanti cutanei, se causa eccessiva irritazione cutanea nel topo, nonché la natura del rapporto dose-risposta rilevato. Queste e altre considerazioni sono illustrate in dettaglio in altra sede (4).

33. La raccolta di dati a livello di singolo animale consentirà di eseguire un'analisi statistica della presenza e del grado di rapporto dose-risposta nei dati. Una qualsiasi analisi statistica potrebbe comprendere una valutazione del rapporto dose-risposta oltre che confronti debitamente aggiustati di gruppi sperimentali (ad esempio, confronti parallelizzati tra gruppo dosato e gruppo trattato con veicolo/solvente parallelo). Le analisi statistiche possono includere, ad esempio, la regressione lineare o il test di William per valutare l'andamento della dose-risposta, e il test di Dunnett per confronti parallelizzati. Nella scelta di un metodo adeguato di analisi statistica, lo sperimentatore deve essere consapevole di possibili ineguaglianze delle varianze e di altri problemi correlati che possono richiedere una trasformazione dei dati o un'analisi statistica non parametrica. In ogni caso lo sperimentatore potrebbe dover calcolare l'SI e svolgere analisi statistiche con e senza determinati punti (talvolta denominati «aberranti»).

DATI E RELAZIONE

Dati

34. I dati vanno riassunti sotto forma di tabella, evidenziando i valori RLU medi individuali, il valore RLU medio per ciascun animale, il termine di errore associato (ad esempio, SD, SEM) e l'indice di stimolazione medio per ciascun gruppo di dose rispetto al gruppo del controllo parallelo con veicolo/solvente.

Relazione sull'esecuzione del saggio

35. La relazione deve contenere le seguenti informazioni:

Sostanze di prova e di controllo

— dati di identificazione (ad esempio, numero CAS e numero CE, se disponibili; origine; purezza; impurità note; numero di lotto);

— natura fisica e proprietà fisico-chimiche (ad esempio, volatilità, stabilità, solubilità);

— se si tratta di una miscela, composizione e percentuali relative dei componenti;

Solvente/veicolo

— dati di identificazione (purezza; concentrazione, ove pertinente; volume usato);

— giustificazione per la scelta del veicolo;

▼M3

Animali sperimentali

— origine dei topi del ceppo CBA;

— condizioni microbiologiche degli animali, se note;

— numero ed età degli animali;

— origine degli animali, condizioni di alloggio, dieta ecc.;

Condizioni del saggio

— origine, numero di lotto, assicurazione della qualità/dati sul controllo della qualità del fabbricante per il kit ATP;

— dettagli relativi alla preparazione e all'applicazione della sostanza di prova;

— giustificazione per la scelta delle dosi, compresi i risultati del saggio preliminare, se eseguito;

— concentrazioni del veicolo e della sostanza e quantità totale di sostanza applicata;

— dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo/origine della dieta, origine dell'acqua);

— dettagli dei programmi di trattamento e di campionamento;

— metodi di misurazione della tossicità;

— criteri per considerare gli studi positivi o negativi;

— dettagli di eventuali deviazioni dal protocollo e spiegazione su come la deviazione influenzi il progetto e i risultati dello studio;

Controllo dell'affidabilità

— riassunto dei risultati del più recente controllo dell'affidabilità, comprese informazioni sulla sostanza, la concentrazione e il veicolo usato;

— dati sui controlli positivi e/o negativi (solvente/veicolo), paralleli e/o storici, per il laboratorio di prova;

— se non è stato incluso un controllo positivo parallelo, la data e la relazione del laboratorio per il controllo positivo periodico più recente e una relazione che riporta nel dettaglio i dati storici sui controlli positivi per il laboratorio, che giustifichi la scelta di base di non effettuare un controllo positivo parallelo;

Risultati

— peso dei singoli animali all'inizio dell'applicazione delle dosi e della soppressione programmata, oltre che il termine di errore medio e associato (ad esempio, SD, SEM) per ciascun gruppo di trattamento;

— momento dell'insorgenza e decorso degli eventuali segni di tossicità, compresa l'eventuale irritazione cutanea nel punto di applicazione della somministrazione, per ciascun animale;

— momento dell'eliminazione dell'animale e momento della misurazione ATP per ciascun animale;

— tabella dei valori RLU individuali e dei valori SI per ciascun gruppo di trattamento;

— termine di errore medio e associato (ad esempio, SD, SEM) per valore RLU per topo per ciascun gruppo di trattamento e i risultati dell'osservazione aberrante per ciascun gruppo di trattamento;

▼M3

— indice di stimolazione calcolato e un'adeguata misura della variabilità che tenga conto della variabilità interanimale sia nella sostanza sperimentale che nei gruppi di controllo;

— rapporto dose-risposta;

— analisi statistiche, ove pertinenti;

Discussione dei risultati

— breve commento sui risultati, sull'analisi dose-risposta e sulle analisi statistiche, ove pertinenti, con una conclusione sulla necessità o meno di considerare la sostanza di prova un sensibilizzante cutaneo.

BIBLIOGRAFIA

(1) OCSE (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol*., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol*., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.,* 36, 327-333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol. 34*, 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process.*Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint.*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.,* 58, 1-10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.,* 58, 11-26.

(14) OCSE (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol*., 46, 1896-1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 55, 90-96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth*., 160, 81-88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth*., 72, 127-132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.,* 24, 27-34.

(20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol*., 305, 346-370.

(21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol*., 238, 71-89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*., 93, 13-31.

(25) OCSE (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol*., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.,* 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6Cice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(36) OCSE (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health,* 53 563-79.

(38) OCSE (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment,* Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO (2005)14, OCSE, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

Appendice 1

DEFINIZIONI

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo di prova e i valori di riferimento accettati. Misura l'efficienza del metodo di prova e rappresenta un aspetto della pertinenza. Il termine è usato spesso in modo intercambiabile con «concordanza» per indicare la proporzione di risultati corretti di un metodo di prova (38).

Sostanza di riferimento: sostanza irritante o non irritante usata come standard di confronto rispetto a una sostanza di prova. Una sostanza di riferimento dovrebbe avere le seguenti proprietà: i) origine o origini coerenti e affidabili; ii) analogia strutturale e funzionale alla classe delle sostanze in esame; iii) caratteristiche fisiche/chimiche conosciute; iv) dati di supporto relativi agli effetti noti; v) efficacia nota nell'ambito della reazione auspicata.

Falso negativo: una sostanza di prova erroneamente identificata da un metodo di prova come negativa o non attiva, mentre in realtà si tratta di una sostanza positiva o attiva.

Falso positivo: una sostanza di prova erroneamente identificata da un metodo di prova come positiva o attiva, mentre di fatto si tratta di una sostanza negativa o non attiva.

Pericolo: un potenziale effetto avverso per la salute o l'ambiente. L'effetto avverso si manifesta soltanto se c'è un'esposizione di livello sufficiente.

Riproducibilità fra laboratori: una misura della possibilità che laboratori qualificati diversi, seguendo lo stesso protocollo e testando le stesse sostanze di prova, riproducano risultati qualitativamente e quantitativamente simili. La riproducibilità fra laboratori è determinata nel corso dei processi di pre-validazione e validazione e indica la misura in cui un saggio può essere trasferito efficacemente tra laboratori; è detta anche riproducibilità inter-laboratorio (38).

Riproducibilità all'interno del laboratorio: La misura della possibilità che persone qualificate all'interno del medesimo laboratorio, seguendo un protocollo specifico, replichino efficacemente i risultati di un saggio. È detta anche riproducibilità intra-laboratorio (38).

Aberrante: un'osservazione aberrante è un'osservazione marcatamente diversa dagli altri valori in un campione casuale di popolazione.

Assicurazione della qualità: un processo di gestione in base al quale l'aderenza a standard e requisiti di prova e a procedure di registrazione propri di un laboratorio e l'accuratezza del trasferimento dei dati sono valutate da individui indipendenti rispetto a coloro che eseguono le prove.

Affidabilità: misura in cui un metodo può essere riprodotto nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi utilizzando il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità intra-laboratorio e inter-laboratorio (38).

Irritazione cutanea: Un processo immunologico che si verifica quanto un individuo suscettibile è esposto a livello topico a un allergene chimico, che provoca una risposta immunitaria cutanea che può portare allo sviluppo di sensibilizzazione da contatto.

Indice di stimolazione (SI): Un valore calcolato per valutare il potenziale di irritazione cutanea di una sostanza di prova, corrispondente al rapporto della proliferazione nei gruppi trattati rispetto a quella del gruppo di controllo trattato contemporaneamente con veicolo.

Sostanza di prova (o sostanza sperimentale): qualsiasi sostanza o miscela testata seguendo il presente metodo di prova.

▼M3

B.51. **SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA: LOCAL LYMPH NODE ASSAY: BrdU-ELISA**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼M4

B.52. TOSSICITÀ ACUTA PER INALAZIONE — METODO DELLA CLASSE DI TOSSICITÀ ACUTA

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 436 (2009). La prima linea guida sulla tossicità acuta per inalazione (TG n. 403) è stata adottata nel 1981 e successivamente riveduta (cfr. capitolo B.2 del presente allegato) (1). Dopo l'adozione della revisione del metodo della classe di tossicità acuta per via orale (capitolo B.1 *ter* del presente allegato) (5), si è ritenuto opportuno mettere a punto un metodo della classe di tossicità acuta per inalazione (2) (3) (4). Una valutazione retrospettiva di questo metodo ne ha dimostrato l'idoneità ai fini della classificazione e dell'etichettatura (6). Il metodo di prova della classe di tossicità acuta per inalazione consente di classificare la tossicità della sostanza chimica in esame mediante una serie di fasi in cui si saggiano concentrazioni fisse predeterminate. Sebbene la letalità sia l'endpoint fondamentale, gli animali che presentano segni di dolore e sofferenza gravi o morte imminente devono essere sottoposti a eutanasia per ridurne al minimo la sofferenza. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 19 (7) contiene indicazioni utili per riconoscere tali segni.

2. Nel documento d'orientamento sulle prove di tossicità acuta per inalazione (documento d'orientamento n. 39) (8) figurano indicazioni sull'esecuzione e sull'interpretazione del presente metodo di prova.

3. Le definizioni usate nell'ambito del presente metodo di prova figurano nell'appendice 1 e nel documento di orientamento n. 39 (8).

4. Questo metodo fornisce informazioni sulla pericolosità della sostanza esaminata, permettendone la classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 per la classificazione delle sostanze chimiche che causano tossicità acuta (9). Qualora sia necessario effettuare stime puntuali di valori di CL_{50} o analisi della curva concentrazione-risposta, il metodo più adatto è quello descritto nel capitolo B.2 del presente allegato (1). Per ulteriori indicazioni sulla scelta del metodo di prova, consultare il documento di orientamento n. 39 (8). Questo metodo di prova non è specificamente destinato a testare materiali speciali come le materie isometriche o fibrose poco solubili o i nanomateriali di sintesi.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

5. Prima di eseguire una prova in base a questo metodo, il laboratorio deve considerare tutte le informazioni disponibili sulla sostanza chimica in esame, ivi compresi gli studi esistenti i cui risultati concorrano ad escludere la necessità di ulteriori prove, al fine di ricorrere il meno possibile all'impiego di animali. Tra le informazioni utili per la scelta della specie, del ceppo, del sesso, della modalità di esposizione e delle concentrazioni più adeguati, rientrano l'identità, la struttura chimica e le proprietà fisico-chimiche della sostanza in esame, i risultati di eventuali altre prove di tossicità in vitro o in vivo, l'impiego o gli impieghi previsti e potenziali per l'esposizione umana, dati (Q)SAR e dati tossicologici disponibili in merito alle sostanze chimiche di struttura affine. Non si deve utilizzare il presente metodo per saggiare concentrazioni che si prevede provochino dolore e sofferenza gravi a causa di proprietà corrosive ([1]) o fortemente irritanti (cfr. documento di orientamento n. 39) (8).

([1]) La valutazione della corrosività può fondarsi sul parere di esperti che tenga conto di dati sperimentali sull'uomo e su animali, dati (in vitro) esistenti (ad esempio capitolo B.40 (10) e B.40 *bis* (11) del presente allegato, oppure linea guida OCSE n. 435 (12), valori del pH, informazioni concernenti sostanze simili od ogni altro dato pertinente.

▼M4

PRINCIPIO DELLA PROVA

6. Mediante un procedimento articolato in fasi successive che prevede un periodo di esposizione di 4 ore alla sostanza in esame, si ricavano informazioni sulla sua tossicità acuta per inalazione sufficienti a consentirne la classificazione. La durata dell'esposizione può essere diversa se necessario a fini di legge. In ciascuna fase di prova di una concentrazione prestabilita sono utilizzati 3 animali dello stesso sesso. In unzione del numero di animali morti e/o moribondi, possono bastare 2 fasi per valutare la tossicità acuta della sostanza in esame. Se uno dei due sessi è più sensibile dell'altro, si può proseguire la prova solo con gli animali del sesso più sensibile. L'esito di una fase determina come proseguire nella fase successiva, nei seguenti termini:

a) non occorrono altre prove;

b) si sottopongono alla prova 3 animali di ciascun sesso; oppure

c) si sottopongono alla prova 6 animali solo del sesso più sensibile, ossia il limite inferiore della classe di tossicità deve essere determinato in base a prove con 6 animali per gruppo di concentrazione in esame, indipendentemente dal sesso.

7. Gli animali moribondi o che manifestano segni evidenti di dolore o di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia e, ai fini dell'interpretazione dei risultati della prova, sono considerati alla stregua di animali morti spontaneamente nel corso dell'esperimento. I criteri da applicare per decidere in merito all'eutanasia degli animali moribondi o in stato di grave sofferenza sono oggetto del documento di orientamento n. 19 (7), che contiene anche indicazioni su come riconoscere i segni di morte prevedibile o imminente.

DESCRIZIONE DEL METODO

Selezione delle specie animali

8. Si devono utilizzare animali adulti, giovani e sani appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. La specie preferita è il ratto. Occorre motivare l'eventuale scelta di un'altra specie.

Preparazione degli animali

9. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. Il giorno dell'esposizione, gli animali selezionati devono essere giovani adulti di età compresa tra 8 e 12 settimane, il cui peso corporeo non eccede ± 20 % del peso medio, per ciascun sesso, degli animali della stessa età precedentemente esposti. Gli animali sono scelti a caso e marcati individualmente per poterli identificare. Affinché si acclimatino alle condizioni di laboratorio, devono essere lasciati nelle gabbie per almeno 5 giorni prima dell'inizio della prova e, poco prima della prova, vanno anche acclimatati alle apparecchiature utilizzate per le prove, per attenuare la tensione causata dal nuovo ambiente.

Allevamento degli animali

10. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 ± 3 °C. L'umidità relativa va idealmente mantenuta tra 30 % e 70 %, anche se ciò potrebbe non essere possibile quando si utilizza l'acqua come veicolo. Prima e dopo l'esposizione, gli animali sono generalmente tenuti in gabbia, suddivisi per sesso e concentrazione, ma il numero di animali per gabbia non deve interferire con un'agevole osservazione di ogni singolo animale e deve ridurre al minimo le perdite dovute a cannibalismo e combattimenti. Se l'esposizione avviene unicamente per via nasale, potrebbe essere necessario abituarli ai dispositivi di contenzione, che non dovrebbero provocare agli animali eccessivi stress fisici, termici o dinamici. La contenzione può incidere sui parametri fisiologici, come la temperatura corporea (ipertermia) e/o il volume respiratorio

▼M4

al minuto. Se si dispone di dati generici che dimostrano che nessuna di queste alterazioni avviene a un livello apprezzabile, il periodo di acclimatamento ai dispositivi di contenzione non è necessario. Gli animali esposti «a corpo intero» ad un aerosol devono essere stabulati separatamente per la durata dell'esposizione per evitare che l'aerosol filtri attraverso il pelo degli altri animali presenti nella gabbia. Salvo nei periodi di esposizione, gli animali possono essere nutriti in base a diete convenzionali e certificate da laboratorio, accompagnate da acqua potabile a volontà. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità.

Camere di inalazione

11. La scelta della camera di inalazione dipende dalla natura della sostanza chimica in esame e dalla finalità della prova. Il metodo preferito di esposizione è quello per via nasale (con cui s'intende l'esposizione unicamente della testa, del naso o del muso). Di norma si predilige l'esposizione per via nasale per gli studi di aerosol liquidi o solidi e di vapori che si possono condensare sotto forma di aerosol. L'esposizione del corpo intero può essere più indicata per conseguire obiettivi di studio particolari, ma tale scelta deve essere giustificata nella relazione sullo studio. Per garantire la stabilità atmosferica di una camera di esposizione del corpo intero, il volume complessivo degli animali sottoposti alla prova non deve superare il 5 % del volume della camera. Il documento orientativo 39 (8) descrive i principi delle tecniche di esposizione del corpo intero e per sola via nasale, nonché i relativi vantaggi e svantaggi.

CONDIZIONI DI ESPOSIZIONE

Somministrazione delle concentrazioni

12. Si raccomanda un'esposizione della durata fissa di quattro ore, escludendo il tempo di equilibrazione. Per esigenze specifiche può essere necessario ricorrere ad altri tempi di esposizione, nel qual caso occorre fornire una giustificazione nella relazione sullo studio (cfr. documento di orientamento n. 39) (8). Gli animali esposti in camere «a corpo intero» devono essere stabulati individualmente per evitare che gli animali coabitanti ingeriscano la sostanza in esame pulendosi reciprocamente il mantello. Durante il periodo di esposizione l'alimentazione va sospesa. Nel corso dell'esposizione «a corpo intero» si può continuare a somministrare acqua.

13. Gli animali sono esposti alla sostanza in esame sotto forma di gas, vapore, aerosol o una loro miscela. Lo stato fisico da saggiare dipende dalle proprietà fisico-chimiche della sostanza in esame, dalla concentrazione prescelta e/o dalla forma fisica nella quale è più probabile che essa si presenti nel corso della sua manipolazione e del suo utilizzo. Le sostanze igroscopiche e reattive dal punto di vista chimico devono essere saggiate in atmosfera secca. Prestare attenzione ad evitare concentrazioni esplosive.

Distribuzione granulometrica

14. La granulometria deve essere effettuata per tutti gli aerosol e i vapori che potrebbero condensarsi e formare aerosol. Per consentire l'esposizione di tutte le zone pertinenti delle vie respiratorie, si raccomanda di utilizzare aerosol con diametro aerodinamico mediano di massa (DAMM) da 1 a 4 μm con una deviazione standard geometrica (σ_g) compresa tra 1,5 e 3,0 (8) (13) (14). Occorre fare quanto possibile per rispettare queste condizioni, ma qualora non ci si riuscisse è necessario presentare il parere di un esperto. Ad esempio, le particelle dei fumi metallici possono essere più piccole del limite inferiore sopraindicato, e le particelle caricate, le fibre e il materiale igroscopico (le cui dimensioni aumentano nell'ambiente umido delle vie respiratorie) possono oltrepassare il limite superiore.

▼M4

Preparazione della sostanza in esame in un veicolo

15. Per ottenere la concentrazione e la granulometria adeguate della sostanza in esame nell'atmosfera si può utilizzare un veicolo. Di norma è preferibile utilizzare l'acqua. Per ottenere la distribuzione granulometrica desiderata il materiale particellato può essere sottoposto a processi meccanici, avendo però cura di non decomporre o alterare la sostanza in esame. Se si ritiene che i processi meccanici abbiano provocato alterazioni (ad esempio, a causa delle alte temperature generate dalla frizione durante una macinazione eccessiva), si deve analizzare la composizione chimica della sostanza in esame. Prestare particolare attenzione a non contaminare la sostanza in esame. Non è necessario saggiare le sostanze granulari non friabili, appositamente concepite per non poter essere inalate. Per dimostrare che la manipolazione del materiale granulare non produce particelle respirabili, effettuare una prova di logorio per attrito. Se questa produce particelle respirabili, effettuare una prova di tossicità per inalazione.

Animali di controllo

16. Non è necessario un gruppo di controllo negativo (aria) in parallelo. Se per produrre l'atmosfera di prova si utilizza un veicolo diverso dall'acqua, è necessario allestire un gruppo di controllo del veicolo solo se non si dispone di dati storici sulla tossicità. Se lo studio di tossicità di una sostanza in esame incorporata in un veicolo non rivela alcuna tossicità, significa che il veicolo non è tossico alla concentrazione saggiata e pertanto non è necessario allestire un gruppo di controllo del veicolo.

MONITORAGGIO DELLE CONDIZIONI DI ESPOSIZIONE

Flusso d'aria nella camera di esposizione

17. Durante ogni esposizione è necessario regolare attentamente, monitorare in continuo e registrare almeno una volta l'ora il flusso d'aria nella camera. Il monitoraggio della concentrazione (o stabilità) dell'atmosfera di prova costituisce una misura permanente di tutti i parametri dinamici e un modo indiretto di controllare tutti quelli che regolano la produzione dell'atmosfera di prova. Si farà il possibile, nelle camere d'esposizione unicamente per via nasale, per evitare la reinalazione qualora il flusso d'aria attraverso il sistema di esposizione non sia in grado di produrre una circolazione dinamica dell'atmosfera che contiene la sostanza in esame. Esistono metodologie specifiche a cui si può ricorrere per dimostrare l'assenza di reinalazione nelle condizioni sperimentali prescelte (8) (15). La concentrazione di ossigeno deve essere pari ad almeno il 19 % e la concentrazione di biossido di carbonio non deve superare l'1 %. Qualora si ritenga di non rispettare queste concentrazioni, è necessario misurarle.

Temperatura e umidità relativa della camera

18. La temperatura della camera deve essere mantenuta a 22 ± 3 °C. Sia nel caso delle esposizioni unicamente per via nasale che per le esposizioni del corpo intero, l'umidità relativa nella zona in cui respira l'animale è monitorata e registrata almeno tre volte per le prove che durano fino a 4 ore, oppure una volta l'ora per le prove più brevi. L'umidità relativa dovrebbe idealmente essere mantenuta tra 30 % e 70 % ma può accadere che questi valori non siano raggiungibili (ad esempio, quando si studiano miscele acquose) o che non possa essere misurata per via delle interferenze della sostanza con il metodo di prova.

▼M4

Concentrazione nominale della sostanza chimica in esame

19. Laddove possibile, si deve calcolare e registrare la concentrazione nominale nella camera di esposizione. La concentrazione nominale è data dalla divisione della massa della sostanza in esame generata per il volume totale di aria circolata nella camera. La concentrazione nominale non serve a caratterizzare l'esposizione degli animali, ma un confronto tra la concentrazione nominale e la concentrazione reale dà un'indicazione dell'efficacia del sistema di prova quanto alla sua capacità di generazione e può essere utile per individuare eventuali problemi a questo livello.

Concentrazione reale della sostanza chimica in esame

20. La concentrazione reale è la concentrazione della sostanza in esame nella zona della camera di inalazione in cui gli animali respirano. Le concentrazioni reali possono essere determinate con metodi specifici (ad esempio campionamento diretto, metodi di adsorbimento o di reazione chimica, e successiva caratterizzazione analitica) o con metodi non specifici, come l'analisi gravimetrica mediante filtrazione. Il ricorso all'analisi gravimetrica è ammissibile solo per gli aerosol di polveri che contengono un unico componente o per gli aerosol di liquidi poco volatili e deve fondarsi su opportune caratterizzazioni specifiche della sostanza in esame effettuate prima dello studio in corso. È possibile ricorrere all'analisi gravimetrica anche per determinare la concentrazione di un aerosol di polveri con vari componenti, ma in tal caso sono necessari dati analitici che dimostrino che la composizione del prodotto in sospensione nell'aria è analoga a quella del prodotto di partenza. In assenza di questi dati, può essere necessario rianalizzare periodicamente la sostanza in esame (idealmente in sospensione nell'aria) durante lo studio. Per gli agenti aerosolizzati che possono evaporare o sublimarsi, occorre dimostrare che tutte le fasi sono state raccolte con il metodo prescelto. Le concentrazioni bersaglio, nominali e reali devono essere riportate nella relazione, ma nell'analisi statistica per calcolare i valori delle concentrazioni letali sono utilizzate solo le concentrazioni reali.

21. Si utilizza, se possibile, un unico lotto della sostanza in esame e il campione allo studio va conservato in condizioni che ne mantengano la purezza, l'omogeneità e la stabilità. Prima di iniziare lo studio, occorre caratterizzare la sostanza in esame, valutandone anche la purezza e, se tecnicamente fattibile, l'identità e le quantità dei contaminanti e delle impurità individuati. A tal fine occorre conoscere quanto meno i dati seguenti: tempo di ritenzione e relativa area del picco, peso molecolare risultante dalla spettroscopia di massa o dalla gascromatografia, oppure altre stime. Il laboratorio che effettua la prova non è responsabile dell'identità del campione in esame, tuttavia, per precauzione, è consigliabile che confermi almeno una parte delle caratteristiche fornite dallo sponsor (colore, natura fisica ecc.).

22. L'atmosfera di esposizione è mantenuta il più costante possibile e monitorata in continuo e/o in modo intermittente secondo il metodo di analisi. Quando si procede ad un campionamento intermittente, in uno studio di quattro ore si devono raccogliere campioni dell'atmosfera della camera almeno due volte. Se ciò non è possibile, per via di limitazioni inerenti al flusso d'aria o delle basse concentrazioni, è possibile prelevare un solo campione nell'intero periodo di esposizione. Se si osservano evidenti fluttuazioni da un campione all'altro, per le concentrazioni successive si devono prelevare quattro campioni per esposizione. La concentrazione dei singoli campioni prelevati nella camera non deve deviare dalla concentrazione media della camera più del ± 10 %, nel caso di gas e vapori, o ± 20 % nel caso degli aerosol liquidi o solidi. Occorre calcolare e prender nota del tempo necessario affinché la camera di esposizione raggiunga l'equilibrio (t_{95}). La durata di un'esposizione corrisponde al tempo in cui la sostanza in esame viene generata, ivi compreso il tempo necessario per raggiungere t_{95}. Il documento di orientamento n. 39 (8) contiene indicazioni per la stima di t_{95}.

▼M4

23. Per miscele molto complesse costituite da gas o vapori e da aerosol (ad esempio, atmosfere di combustione e sostanze chimiche generate per propulsione da appositi prodotti/dispositivi finali), ogni fase può comportarsi diversamente nella camera di inalazione. Per ciascuna fase (gas/vapore e aerosol) occorre pertanto scegliere almeno una sostanza indicatrice (analita), normalmente il principio attivo principale della miscela. Quando la sostanza chimica in esame è una miscela, nella relazione dovrà essere indicata la concentrazione analitica corrispondente alla miscela e non solo quella del principio attivo o del componente in esame (analita). Informazioni aggiuntive sulle concentrazioni effettive sono reperibili nel documento di orientamento n. 39 (8).

Granulometria della sostanza chimica in esame

24. La distribuzione granulometrica degli aerosol deve essere determinata almeno due volte nel corso di ciascuna esposizione di 4 ore, utilizzando un impattore a cascata o un altro strumento, come uno spettrometro per la misura delle dimensioni aerodinamiche delle particelle. Se i risultati ottenuti con l'impattore a cascata e con l'altro strumento risultano equivalenti, quest'ultimo può essere utilizzato nel corso dell'intero studio. Per confermare l'efficienza di estrazione dello strumento principale, occorre utilizzare parallelamente un secondo strumento, come un filtro gravimetrico o un impinger/gorgogliatore. La concentrazione massica ottenuta dall'analisi granulometrica deve avvicinarsi, con scarti ragionevoli, a quella ottenuta con l'analisi su filtri [cfr. documento di orientamento n. 39 (8)]. Se questa equivalenza viene stabilita nella fase iniziale dello studio, non è necessario effettuare ulteriori misure di conferma. Per il benessere degli animali occorre ridurre il più possibile i dati non conclusivi che potrebbero comportare la necessità di ripetere un'esposizione. È necessario effettuare un'analisi granulometrica nel caso di vapori che rischiano di condensarsi e formare aerosol o se si rilevano particelle in un'atmosfera di vapori che si presume possano formare fasi miste (cfr. paragrafo 14).

PROCEDURA

Prova principale

25. In ogni fase si utilizzano tre animali di ciascun sesso, oppure sei animali del sesso più sensibile. Se per l'esposizione solo per via nasale s'impiegano specie di roditori diverse dai ratti, è possibile adeguare la durata massima d'esposizione per ridurre al minimo lo stress tollerato dalla specie in causa. Come dose iniziale si sceglie quella tra le quattro concentrazioni fisse che ha la maggior probabilità di produrre effetti tossici in alcuni degli animali esposti. Gli schemi di prova per i gas, i vapori e gli aerosol (che figurano nelle appendici da 2 a 4) rappresentano il procedimento da seguire in funzione dei valori limite delle categorie CLP da 1a 4 (9) stabilite per i gas (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4 h) (appendice 2), per i vapori (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4 h) (appendice 3) e per gli aerosol (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4 h) (appendice 4). La categoria 5, che non è prevista dal regolamento (CE) n. 1272/2008 (regolamento CLP) (9) si riferisce alle concentrazioni al di sopra del relativo limite. Ad ogni concentrazione iniziale si applica lo schema di prova corrispondente. Il modus operandi consiste nel seguire le frecce indicate negli schemi in funzione del numero di animali sottoposti a eutanasia o morti spontaneamente, fino a poter stabilire una categoria.

26. L'intervallo di tempo tra l'esposizione dei vari gruppi è determinato dalla comparsa, dalla durata e dalla gravità dei segni di tossicità rilevati. Si espongono animali al livello di concentrazione superiore solo quando si ha la ragionevole certezza che i precedenti animali esposti sono sopravvissuti. Si consiglia di far trascorrere tre o quattro giorni tra le esposizioni per consentire l'osservazione di eventuali segni di tossicità tardiva. L'intervallo di tempo può essere modificato secondo necessità, ad esempio in caso di risposte non conclusive.

▼M4

Prova limite

27. Un prova limite viene effettuata quando si sa per certo o si prevede che la sostanza in esame è praticamente non tossica, ossia che determinerà una reazione di tossicità solo al di sopra della concentrazione limite autorizzata. Le informazioni sulla tossicità della sostanza in esame possono essere ricavate da prove già realizzate con sostanze o miscele simili, tenendo conto dell'identità e della percentuale dei componenti dei quali è nota la rilevanza tossicologica. Se le informazioni sulla tossicità della sostanza in esame sono scarse o nulle, o se ci si attende che sia tossica, è necessario eseguire la prova principale (per ulteriori indicazioni, cfr. documento di orientamento n. 39) (8).

28. Seguendo il procedimento normale, la prova limite del presente metodo di prova consiste nell'esporre tre animali di ciascun sesso, o sei animali del sesso più sensibile, alle concentrazioni di 20 000 ppm per i gas, 20 mg/l per i vapori e 5 mg/l per le polveri/nebbie, se raggiungibili. Per le prove con aerosol, l'obiettivo principale è ottenere particelle di dimensioni respirabili (ossia DAMM da 1 a 4 μm), il che è possibile con la maggior parte delle sostanze testate a una concentrazione di 2 mg/l. Le prove con aerosol a concentrazioni superiori a 2 mg/l sono eseguite solo se si è riusciti a generare particelle di dimensioni respirabili (cfr. documento di orientamento n. 39) (8). Per ragioni legate al benessere degli animali, il sistema GHS (16) sconsiglia di testare concentrazioni superiori alla concentrazione limite. Per quanto concerne la sperimentazione in relazione alla categoria 5 del sistema GHS (16), non prevista dal regolamento (CE) n. 1272/2008 (9), va considerata solo se è altamente probabile che i risultati abbiano una pertinenza diretta con la protezione della salute umana e occorre darne giustificazione nella relazione. Nel caso di sostanze potenzialmente esplosive si devono adottare precauzioni per evitare condizioni che favoriscano un'esplosione. Per evitare il ricorso inutile ad animali, occorre effettuare una prova senza animali prima della prova limite, per accertarsi che sia possibile ottenere le condizioni per quest'ultima nella camera.

OSSERVAZIONI

29. Durante il periodo di esposizione è necessario eseguire frequenti esami clinici degli animali. Dopo l'esposizione, l'esame clinico va effettuato almeno due volte il giorno stesso dell'esposizione, o più spesso a seconda della risposta degli animali al trattamento, e almeno una volta al giorno nei successivi 14 giorni. Il periodo di osservazione non ha durata fissa, in quanto dipende dalla natura dei segni clinici, dal momento della loro comparsa e dalla durata del periodo di recupero. Un elemento importante è rappresentato dal momento della comparsa e della scomparsa dei segni di tossicità, soprattutto se negli animali è rilevabile una tendenza a manifestare segni di tossicità tardiva. Tutte le osservazioni vanno registrate sistematicamente e riportate singolarmente per ciascun animale. Gli animali moribondi o che manifestano dolore intenso e/o segni di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia, per ragioni legate al loro benessere. Occorre fare attenzione, quando si effettua l'esame clinico alla ricerca di segni di tossicità, a non confondere un cattivo aspetto iniziale e alterazioni respiratorie passeggere, imputabili al procedimento di esposizione, con gli effetti dell'esposizione vera e propria. Si devono tenere in considerazione i principi e i criteri riassunti nel documento di orientamento OCSE citato in bibliografia al punto (7). Nel caso di animali sottoposti a eutanasia o rinvenuti morti, il momento del decesso deve essere registrato con la massima precisione possibile.

▼M4

30. Si osserveranno eventuali alterazioni della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose, del sistema respiratorio e circolatorio, del sistema nervoso autonomo e centrale, dell'attività e del comportamento somatomotori. Si annoterà, laddove possibile, l'eventuale differenziazione tra gli effetti locali e sistemici. Particolare attenzione deve essere rivolta all'osservazione di tremori, convulsioni, salivazione, diarrea, letargia, sonno e coma. La misura della temperatura rettale può corroborare una bradipnea riflessa o un'ipo/ipertermia causate dall'esposizione o dalla reclusione.

Peso corporeo

31. Il peso di ciascun animale è rilevato e annotato una volta durante il periodo di acclimatazione, il giorno dell'esposizione, prima che questa abbia inizio (giorno 0), e almeno nei giorni 1, 3 e 7 (e successivamente una volta la settimana), così come al momento del decesso o dell'eutanasia, se posteriore al giorno 1. Il peso corporeo è manifestamente uno dei primi indici di tossicità e gli animali che mostrano un calo ponderale $\geq$ 20 % rispetto al peso anteriore allo studio devono essere osservati attentamente. Alla fine del periodo post esposizione si pesano e si sottopongono a eutanasia gli animali sopravvissuti.

Patologia

32. Tutti gli animali utilizzati (compresi quelli che muoiono nel corso della prova o che sono sottoposti a eutanasia e ritirati dallo studio per motivi legati al loro benessere) devono essere sottoposti a necroscopia macroscopica. Se non è possibile eseguire la necroscopia subito dopo il rilevamento del decesso, l'animale deve essere refrigerato (non congelato) ad una temperatura sufficientemente bassa da rallentare l'autolisi. La necroscopia va effettuata il più rapidamente possibile, di norma entro uno o due giorni dal decesso, annotando per ogni animale tutte le alterazioni patologiche macroscopiche, con particolare attenzione a quelle delle vie respiratorie.

33. È possibile effettuare altri esami previamente inclusi nel disegno sperimentale, per ampliare il valore interpretativo dello studio, quali, ad esempio, la determinazione del peso polmonare nei ratti sopravvissuti e/o la ricerca, per esame microscopico, di irritazioni delle vie respiratorie. Si possono anche esaminare gli organi che mostrano macropatologie negli animali che sopravvivono più di 24 ore, così come gli organi di cui si ha la certezza o il sospetto che siano stati colpiti. L'esame microscopico dell'intero apparato respiratorio può fornire informazioni utili sulle sostanze in esame che reagiscono con l'acqua, come gli acidi e le sostanze chimiche igroscopiche.

DATI E RELAZIONE

Dati

34. Si devono indicare il peso corporeo e i risultati della necroscopia per ciascun animale. I dati degli esami clinici devono essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo sottoposto alla prova, il numero di animali utilizzati, il numero di animali che hanno manifestato segni specifici di tossicità, il numero di animali rinvenuti morti durante la prova o sottoposti a eutanasia, il momento del decesso di ciascun animale, la descrizione degli effetti tossici con indicazioni sul decorso e sulla reversibilità, e l'esito della necroscopia.

▼M4

Relazione sulla prova

35. La relazione deve contenere le seguenti informazioni, a seconda dei casi:

Animali sperimentali e condizioni di allevamento:

— descrizione delle condizioni di stabulazione, tra cui: numero (o modifica del numero) di animali per gabbia, materiale utilizzato per la lettiera, temperatura ambiente e umidità relativa, fotoperiodo e dieta,

— specie/ceppo utilizzati e giustificazione dell'impiego di specie diverse dal ratto,

— numero, età e sesso degli animali,

— metodo di randomizzazione,

— dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo/origine della dieta e origine dell'acqua),

— descrizione dell'eventuale condizionamento prima della prova, in particolare per quanto concerne dieta, quarantena e terapie.

Sostanza chimica in esame:

— natura fisica, purezza e, se del caso, proprietà fisico-chimiche pertinenti (compresa l'isomerizzazione),

— dati di identificazione e numero CAS, se noto.

Veicolo:

— motivazione dell'utilizzo di un veicolo e giustificazione della scelta del veicolo utilizzato (se diverso dall'acqua),

— dati storici o paralleli che dimostrano che il veicolo non interferisce con i risultati dello studio.

Camera di inalazione:

— descrizione della camera di inalazione, che includa le dimensioni e il volume,

— provenienza e descrizione delle apparecchiature utilizzate per l'esposizione degli animali e per la generazione dell'atmosfera,

— apparecchi di misurazione della temperatura, dell'umidità, della granulometria e della concentrazione reale,

— fonte dell'aria, trattamento dell'aria immessa/estratta e sistema di climatizzazione utilizzato,

— metodi utilizzati per tarare l'apparecchiatura al fine di garantire l'omogeneità dell'atmosfera di prova,

— differenza di pressione (positiva o negativa),

— bocchette di esposizione per camera (unicamente via nasale); ubicazione degli animali nel sistema (camera di esposizione «a corpo intero»),

— omogeneità/stabilità nel tempo dell'atmosfera di prova,

— ubicazione dei sensori termometrici e igrometrici e dei punti di campionamento dell'atmosfera di prova nella camera,

— velocità del flusso d'aria, velocità del flusso d'aria in ogni bocchetta di esposizione («a naso solo») o rapporto tra il volume occupato dagli animali e il volume della camera («a corpo intero»),

— informazioni sull'apparecchiatura utilizzata per misurare l'ossigeno e il diossido di carbonio, se applicabile,

▼M4

— tempo necessario per raggiungere l'equilibrio nella camera (t_{95}),

— numero di cambi di volume per ora,

— dosatori (se applicabile).

Dati sull'esposizione:

— giustificazione della scelta della concentrazione bersaglio dello studio principale,

— concentrazioni nominali (ottenute dividendo la massa della sostanza in esame immessa nella camera d'inalazione per il volume dell'aria fatta circolare nella camera),

— concentrazioni reali ottenute nella zona in cui respirano gli animali; per le miscele in esame che producono forme fisiche eterogenee (gas, vapori, aerosol), si può analizzare separatamente ciascuna di esse,

— esprimere le concentrazioni atmosferiche in unità di massa (ad esempio, mg/l, mg/m^3 ecc.), indicando facoltativamente tra parentesi le unità di volume (ad esempio, ppm, ppb),

— distribuzione granulometrica, diametro aerodinamico mediano di massa (DAMM) e deviazione standard geometrica (σ_g), con relativi metodi di calcolo. Devono essere indicate anche le singole analisi granulometriche.

Condizioni sperimentali:

— ragguagli sulla preparazione della sostanza chimica in esame, precisando le eventuali procedure impiegate per ridurre la granulometria delle sostanze solide o per preparare soluzioni della sostanza in esame. Qualora i processi meccanici abbiano alterato la composizione della sostanza, includere i risultati delle analisi eseguite per verificare la composizione,

— descrizione (di preferenza corredata di uno schema) dell'apparecchiatura utilizzata per generare l'atmosfera sperimentale e per esporvi gli animali,

— ragguagli sul metodo d'analisi chimica impiegato e sulla validazione di tale metodo (specificando l'efficienza di recupero della sostanza in esame dal mezzo campionato),

— giustificazione della scelta delle concentrazioni sperimentali.

Risultati:

— tabella con la temperatura, l'umidità e il flusso d'aria nella camera,

— tabella con le concentrazioni nominali e reali nella camera,

— tabella con i dati granulometrici, ivi compresi i dati analitici sul campionamento, sulla distribuzione granulometrica e i calcoli del DAMM e della σ_g,

— tabella con risposta e livello di concentrazione per ciascun animale (vale a dire animali che manifestano segni di tossicità, mortalità compresa, natura, gravità e durata degli effetti),

— peso corporeo di ciascun animale registrato nei giorni in cui si è svolto lo studio, precisando la data e l'ora del decesso, se anteriore all'eutanasia programmata; momento della comparsa dei segni di tossicità, loro decorso ed eventuale reversibilità, per ciascun animale,

▼M4

— reperti necroscopici ed eventuali reperti istopatologici per ciascun animale,

— categoria nel sistema CLP e valore limite della CL_{50}.

Discussione e interpretazione dei risultati:

— dare particolare importanza alla descrizione dei metodi impiegati per soddisfare i criteri del presente metodo di prova, ad esempio per quanto concerne la concentrazione limite o la granulometria,

— esaminare la respirabilità delle particelle alla luce dei risultati complessivi, in special modo se i criteri granulometrici non sono stati soddisfatti,

— tenere conto, nella valutazione globale dello studio, della coerenza dei metodi utilizzati per determinare le concentrazioni nominali e reali e considerare il rapporto tra di esse,

— considerare la causa probabile di decesso e il meccanismo d'azione prevalente (sistemico o locale),

— spiegare perché è stato necessario sottoporre ad eutanasia animali che manifestavano dolore intenso e/o segni di sofferenza grave e persistente, in base ai criteri illustrati nel documento di orientamento dell'OCSE citato in bibliografia al punto (7).

BIBLIOGRAFIA

(1) Capitolo B.2 del presente allegato, Tossicità acuta per inalazione.

(2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243-254.

(3) Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537-549.

(4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1: 129-134.

(5) Capitolo B.1 *ter* del presente allegato, Tossicità acuta orale — Metodo della classe di tossicità acuta.

(6) OCSE (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Disponibile all'indirizzo: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(7) OCSE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Disponibile all'indirizzo: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(8) OCSE (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Disponibile all'indirizzo: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(9) 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 (GU L 353 del 31.12.2008, pag. 1).

▼**M4**

(10) Capitolo B.40 del presente allegato, Corrosione cutanea in vitro: test di resistenza elettrica transcutanea (TER).

(11) Capitolo B.40 *bis* del presente allegato, Corrosione cutanea in vitro: test su modelli di pelle umana.

(12) OCSE (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Disponibile all'indirizzo: http://www.oecd.org/env/testguidelines

(13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

(14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Appl. Toxicol. Toxicol.* 18: 321-327.

(15) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167

(16) ONU (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Disponibile all'indirizzo: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html

▼**M4**

Appendice 1

DEFINIZIONI

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

▼M4

Appendice 2

Procedimento da seguire per i gas in funzione della concentrazione iniziale (ppm/4 h)

Osservazioni generali ([1])

Nella presente appendice è schematizzato il procedimento da seguire per ciascuna concentrazione iniziale.

Appendice 2a: concentrazione iniziale di 100 ppm

Appendice 2b: concentrazione iniziale di 500 ppm

Appendice 2c: concentrazione iniziale di 2 500 ppm

Appendice 2d: concentrazione iniziale di 20 000 ppm

Il procedimento segue le frecce indicate, in funzione del numero di animali sottoposti a eutanasia o morti spontaneamente.

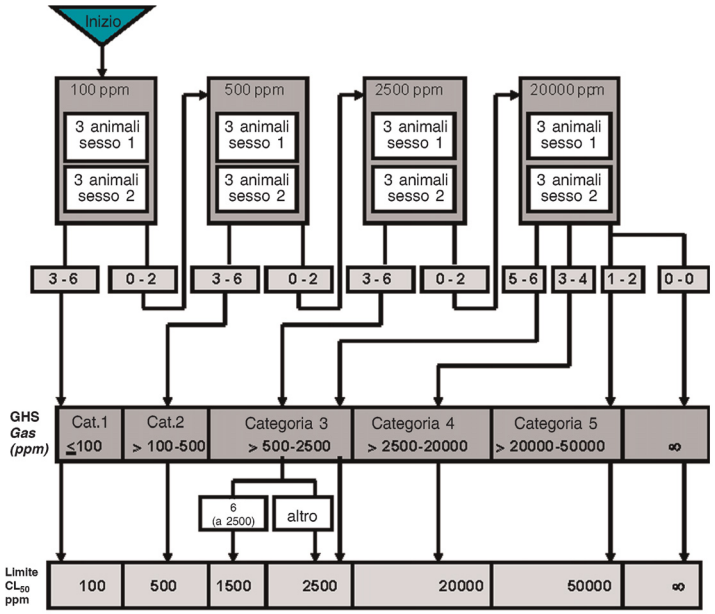
([1]) Le tabelle seguenti fanno riferimento al sistema GHS (Sistema mondiale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche). L'equivalente nell'Unione europea è il regolamento (CE) n. 1272/2008 (9), che non prevede la categoria 5 per la tossicità acuta per inalazione.

▼M4

Appendice 2a

Tossicità acuta per inalazione:

procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 100 ppm/4 h per i gas



— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase

— 0-6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata

— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione

— ∞: senza classificazione

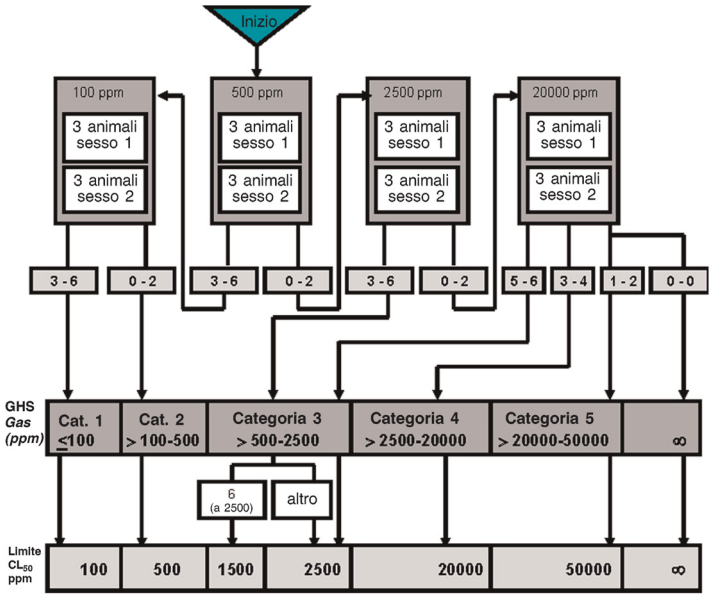
— Prove a ≥ 20000 ppm/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 2b

Tossicità acuta per inalazione:

procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 500 ppm/4h per i gas



— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase

— 0-6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata

— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione

— ∞: senza classificazione

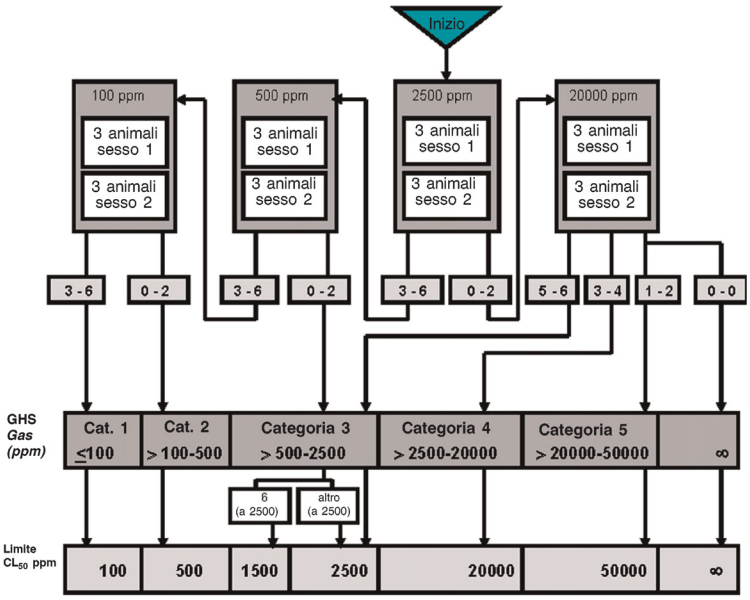
— Prove a ≥ 20000 ppm/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 2c

Tossicità acuta per inalazione:

procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 2 500 ppm/4h per i gas



— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase

— 0–6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata

— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione

— ∞: senza classificazione

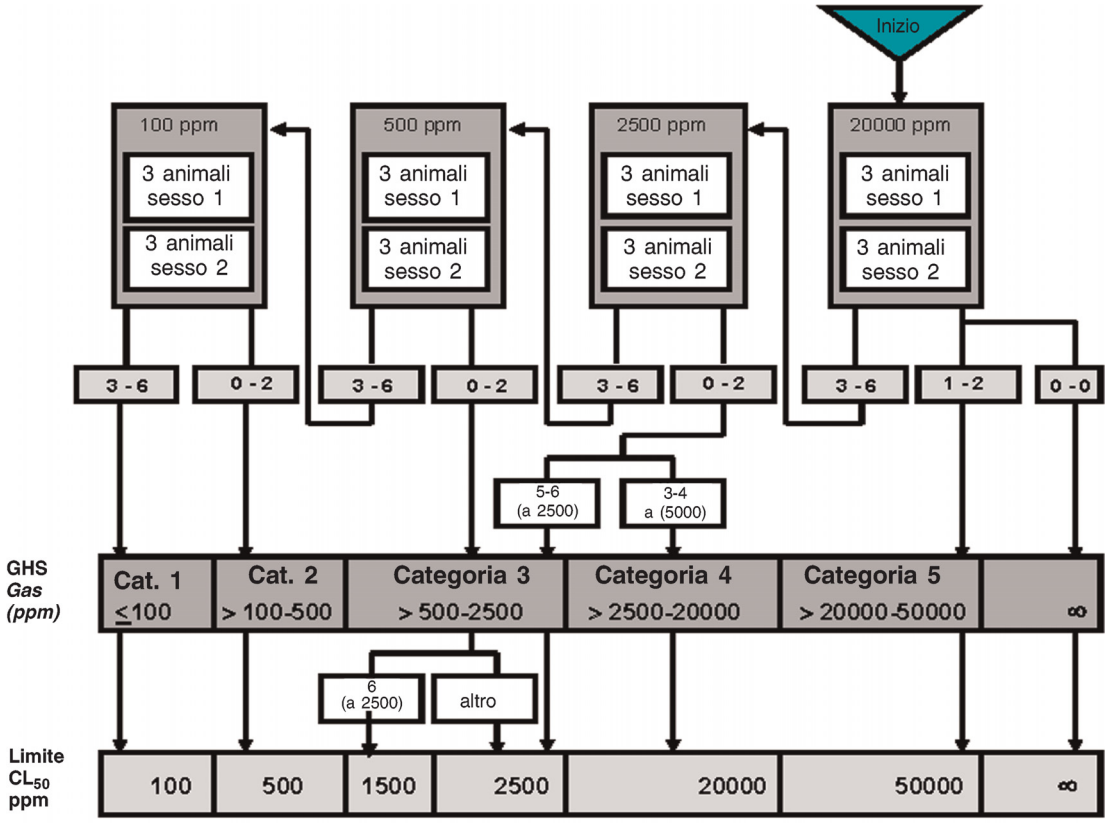
— Prove a ≥ 20000 ppm/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 2d

Tossicità acuta per inalazione:

procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 20 000 ppm/4h per i gas



— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase

— 0-6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata

— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione

— ∞: senza classificazione

— Prove a ≥ 20000 ppm/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 3

Procedimento da seguire per i vapori in funzione della concentrazione iniziale (mg/l/4 h)

Osservazioni generali ([1])

Nella presente appendice è schematizzato il procedimento da seguire per ciascuna concentrazione iniziale.

Appendice 3a: concentrazione iniziale 0,5 mg/l

Appendice 3b: concentrazione iniziale 2,0 mg/l

Appendice 3c: concentrazione iniziale 10 mg/l

Appendice 3d: concentrazione iniziale 20 mg/l

Il procedimento segue le frecce indicate, in funzione del numero di animali sottoposti a eutanasia o morti spontaneamente.

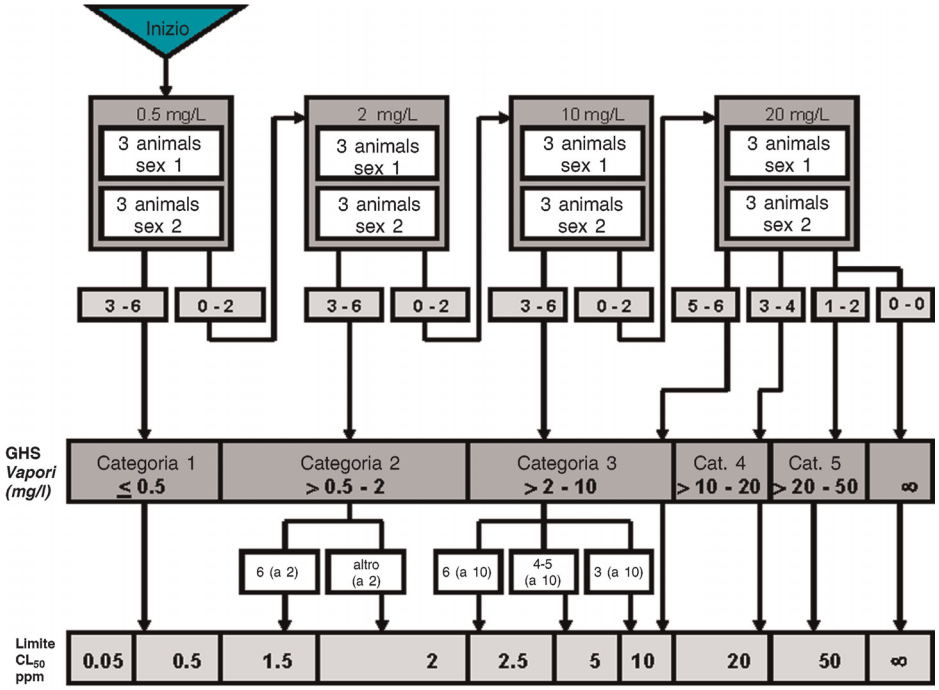
([1]) Le tabelle seguenti fanno riferimento al sistema GHS (Sistema mondiale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche). L'equivalente nell'Unione europea è il regolamento (CE) n. 1272/2008 (9), che non prevede la categoria 5 per la tossicità acuta per inalazione.

▼M4

Appendice 3a

Tossicità acuta per inalazione:

procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 0,5 mg/L/4h per i vapori



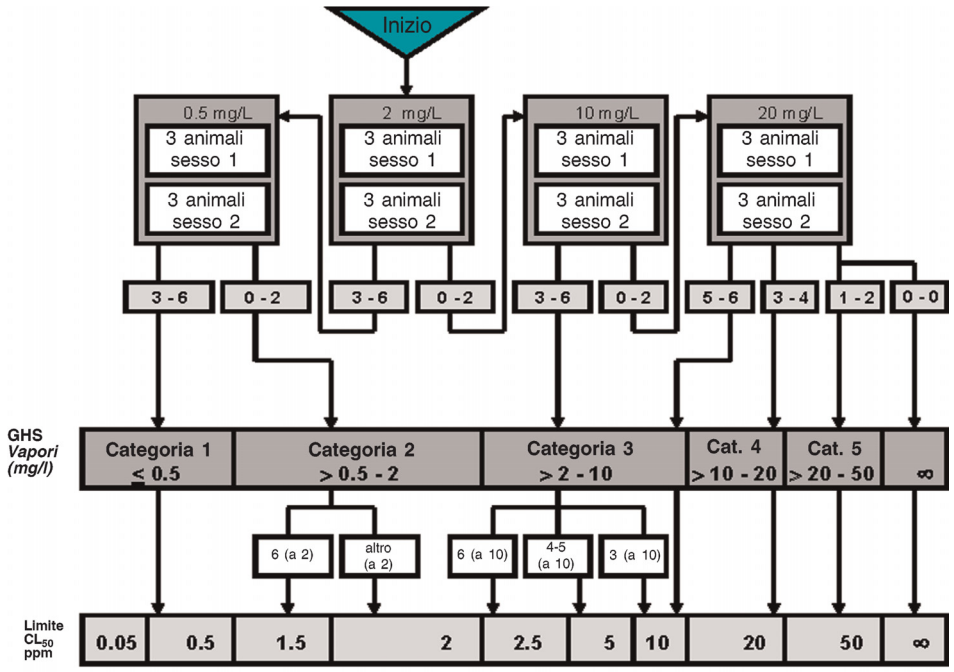
- 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase
- 0-6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata
- GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione
- ∞: senza classificazione
- Prove a 50 mg/L/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 3b

Tossicità Acuta per Inalazione:

Procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 2 mg/L/4h per i vapori



— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase

— 0–6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata

— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione

— ∞: senza classificazione

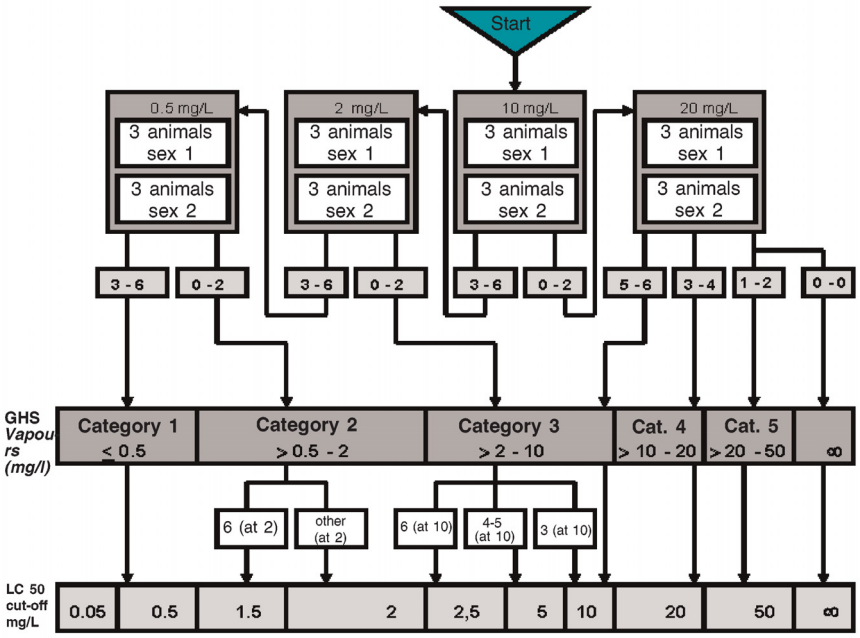
— Prove a 50 mg/L/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 3c

Tossicità Acuta per Inalazione:

Procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 10 mg/L/4h per i vapori



— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase

— 0–6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata

— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione

— ∞: senza classificazione

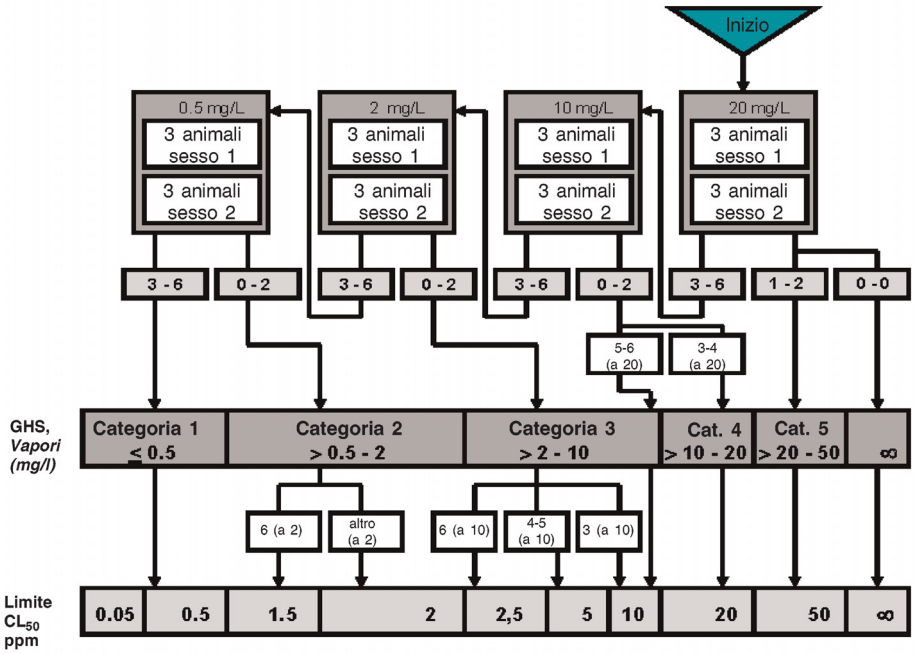
— Prove a 50 mg/L/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 3d

Tossicità Acuta per Inalazione:

Procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 20 mg/L/4h per i vapori



— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase

— 0-6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata

— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione

— ∞: senza classificazione

— Prove a 50 mg/L/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 4

Procedimento da seguire per gli aerosol in funzione della concentrazione iniziale (mg/l/4 h)

Osservazioni generali ([1])

Nella presente appendice è schematizzato il procedimento da seguire per ciascuna concentrazione iniziale.

Appendice 4a: concentrazione iniziale 0,05 mg/l

Appendice 4b: concentrazione iniziale 0,5 mg/l

Appendice 4c: concentrazione iniziale 1 mg/l

Appendice 4d: concentrazione iniziale 5 mg/l

Il procedimento segue le frecce indicate, in funzione del numero di animali sottoposti a eutanasia o morti spontaneamente.

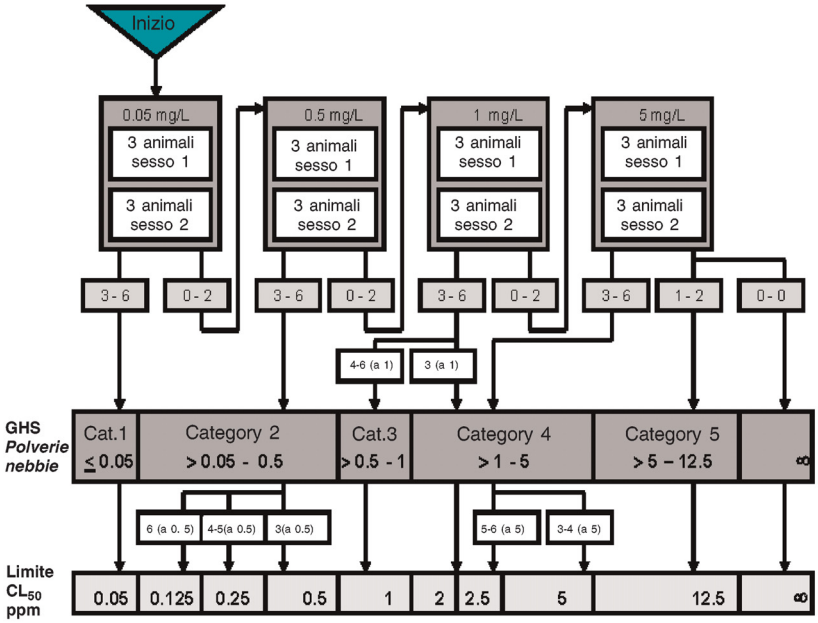
([1]) Le tabelle seguenti fanno riferimento al sistema GHS (Sistema mondiale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche). L'equivalente nell'Unione europea è il regolamento (CE) n. 1272/2008 (9), che non prevede la categoria 5 per la tossicità acuta per inalazione.

▼M4

Appendice 4a

Tossicità Acuta per Inalazione:

Procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 0.05 mg/L/4h per i vapori



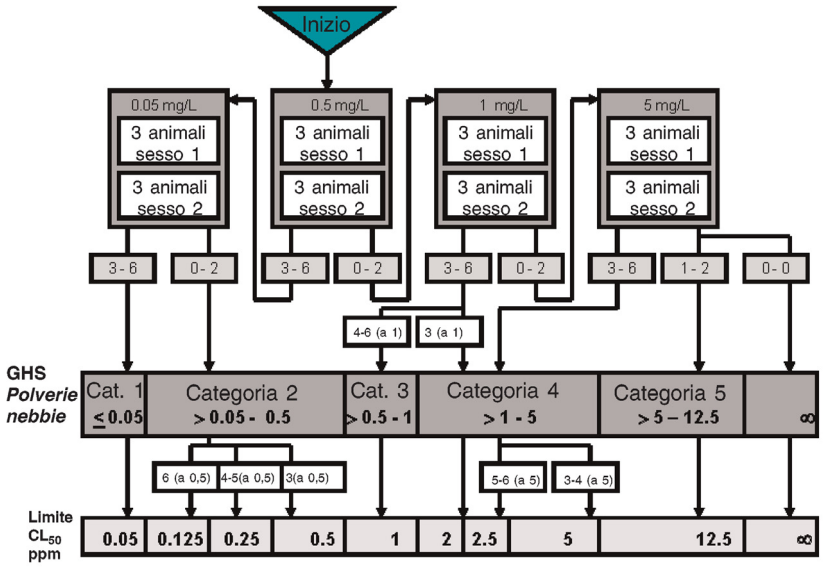
— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase
— 0-6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata
— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione
— ∞: senza classificazione
— Prove a12.5 mg/L/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 4b

Tossicità acuta per inalazione:

procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 0,5 mg/L/4h per gli aerosol



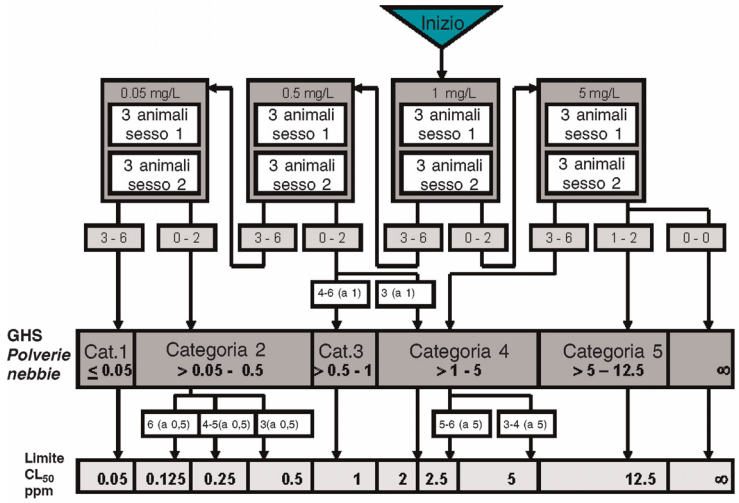
— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase
— 0-6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata
— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione
— ∞: senza classificazione
— Prove a 12.5 mg/L/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 4c

Tossicità acuta per inalazione:

procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 1 mg/L/4h per gli aerosol



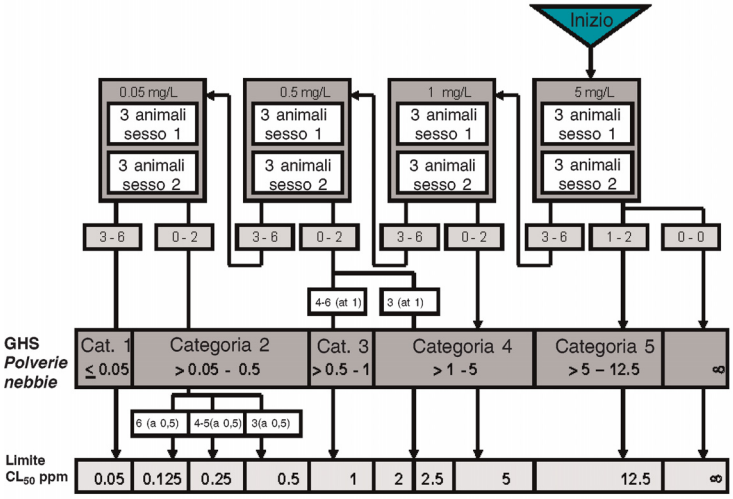
— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase
— 0-6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata
— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione
— ∞: senza classificazione
— Prove a 12.5 mg/L/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)

▼M4

Appendice 4d

Tossicità Acuta per Inalazione:

Procedimento sperimentale con concentrazione iniziale di 5 mg/L/4h per gli aerosol



— 3 ♂ + 3 ♀, o 6 animali del sesso più sensibile saggiati per fase
— 0-6: numero di animali moribondi o morti/concentrazione saggiata
— GHS: Sistema mondiale armonizzato di classificazione
— ∞: senza classificazione
— Prove a 12.5 mg/L/4h: cfr. documento di orientamento n. 39 (8)»

▼M5

B.53. STUDIO DELLA NEUROTOSSICITÀ NELLA FASE DELLO SVILUPPO

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 426 per le prove sulle sostanze chimiche (2007). Nel giugno del 1995, il gruppo di lavoro dell'OCSE sulla tossicità per la riproduzione e lo sviluppo, riunito a Copenaghen, ha esaminato la necessità di aggiornare le linee guida OCSE esistenti in materia e metterne a punto delle nuove per gli endpoint non ancora contemplati (1). Il gruppo di lavoro ha raccomandato che la linea guida per le prove volte a determinare la neurotossicità nella fase dello sviluppo sia redatta in base ad un orientamento dell'agenzia statunitense per la protezione dell'ambiente (EPA), che nel frattempo è stato riveduto (2). Nel giugno del 1996 si è tenuta a Copenaghen una seconda riunione di consultazione, intesa ad elaborare indicazioni più precise che servissero al segretariato per definire una nuova linea guida per le prove sulla neurotossicità nella fase dello sviluppo, a partire dagli elementi principali, quali i dettagli relativi alla scelta della specie animale, il periodo di somministrazione, il periodo di sperimentazione, gli endpoint da esaminare, nonché i criteri per la valutazione dei risultati. Nel 1998 è stata pubblicata una linea guida statunitense per la valutazione del rischio di neurotossicità (3). Nell'ottobre del 2000 si è tenuta una riunione di consultazione di esperti dell'OCSE in parallelo ad un seminario dell'ILSI (Istituto internazionale per le scienze della vita), mentre un'ulteriore riunione di consultazione degli esperti ha avuto luogo a Tokyo nel 2005. Questi incontri sono stati organizzati per discutere le questioni scientifiche e tecniche relative alla linea guida vigente e le raccomandazioni che ne sono scaturite sono state prese in considerazione in sede di elaborazione del presente metodo di prova (4)(5)(6)(7). I documenti d'orientamento dell'OCSE n. 43, *Reproductive Toxicity Testing and Assessment* (8), e n. 20, *Neurotoxicity Testing* (9), contengono ulteriori informazioni sull'esecuzione, sull'interpretazione e sulla terminologia utilizzata per il presente metodo di prova.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

2. Gli effetti neurotossici prodotti da alcune sostanze chimiche sugli esseri umani e su altre specie nella fase dello sviluppo sono noti (10)(11)(12)(13). Per esaminare e valutare le caratteristiche tossiche di una sostanza chimica può essere necessario determinarne il potenziale di neurotossicità nella fase dello sviluppo. Gli studi di neurotossicità nella fase dello sviluppo sono intesi a fornire dati, comprese le caratterizzazioni dose-risposta, relativi ai potenziali effetti funzionali e morfologici sullo sviluppo del sistema nervoso della progenie imputabili all'esposizione in utero e nei primi stadi di vita.

3. Questo tipo di studio può essere a sé stante, costituire parte integrante di uno studio di tossicità per la riproduzione e/o di uno studio di neurotossicità nell'adulto [ad esempio, i metodi di prova B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)], oppure fungere da complemento ad uno studio di tossicità per lo sviluppo prenatale [ad esempio, il metodo di prova B.31 (17)]. Quando lo studio di neurotossicità nella fase dello sviluppo è integrato o collegato ad un altro studio, è necessario preservare l'integrità di entrambi. Tutte le prove devono conformarsi alla legislazione applicabile oppure alle linee guida per l'uso di animali da laboratorio nella ricerca, nazionali o sovranazionali (cfr. nota 18).

4. Prima di effettuare lo studio, il laboratorio che esegue la prova deve tenere conto di tutte le informazioni disponibili sulla sostanza in esame, in particolare riguardo a identità, struttura e proprietà fisico-chimiche, i risultati di eventuali altre prove di tossicità in vitro o in vivo, i dati tossicologici sulle sostanze chimiche di struttura affine e l'impiego o gli impieghi previsti. Queste informazioni sono necessarie per dimostrare a tutti i soggetti interessati l'adeguatezza della prova per la protezione della salute umana e servono a scegliere la giusta dose iniziale.

▼M5

PRINCIPIO DELLA PROVA

5. La sostanza in esame viene somministrata agli animali durante la gestazione e la lattazione. Le madri sono sottoposte a prova per esaminare gli effetti nelle femmine durante la gravidanza e la lattazione e per ottenere, all'occorrenza, informazioni comparative (rispetto alla progenie). La valutazione della neurotossicità è effettuata su discendenti scelti a caso all'interno delle nidiate e consiste in osservazioni volte a rilevare anomalie neurologiche e comportamentali macroscopiche, attraverso l'esame dello sviluppo fisico, dell'ontogenesi del comportamento, dell'attività motoria, della funzione motoria e sensoriale, dell'apprendimento e della memoria, come pure mediante la valutazione del peso del cervello e della neuropatologia durante lo sviluppo postnatale e in età adulta.

6. Se la prova costituisce uno studio a sé stante, è possibile applicare sugli animali supplementari disponibili in ogni gruppo protocolli specifici valutativi del neurocomportamento, della neuropatologia, della neurochimica o dell'elettrofisiologia, che possono completare i dati ottenuti mediante gli esami raccomandati nel presente metodo di prova (16)(19)(20)(21). Questi protocolli integrativi, che possono essere applicati sia sulle madri che sui figli, possono rivelarsi particolarmente utili quando l'osservazione empirica, gli effetti previsti o il meccanismo/modo di azione indicano un tipo specifico di neurotossicità. Possono anche essere utilizzati protocolli ex vivo o in vitro, purché non alterino l'integrità dei protocolli in vivo.

PREPARAZIONE DELLA PROVA

Selezione della specie animale

7. La specie sperimentale preferita è il ratto, ma si possono eventualmente usare anche altre specie. Si tenga presente, tuttavia, che il numero di giorni di gestazione e di sviluppo postnatale considerato nel presente metodo di prova si riferisce ai ceppi di ratti più utilizzati e pertanto, in caso si faccia uso di una specie diversa o di un ceppo inabituale, è necessario che tale numero di giorni si equivalga. L'uso di un'altra specie deve essere giustificata, oltre che sulla base di dati tossicologici, farmacocinetici e/o di altra natura, sulla disponibilità di esami neurocomportamentali e neuropatologici postnatali specifici della specie in questione. Se una prova precedente ha prodotto risultati preoccupanti, occorre considerare la specie o il ceppo da cui sono ottenuti. Poiché i diversi ceppi di ratto rispondono in modo diverso alle prove, si devono fornire elementi attestanti che il ceppo selezionato presenta fecondità e reattività adeguate. Se si utilizzano altre specie occorre documentarne l'attendibilità e la sensibilità dal punto di vista della determinazione della neurotossicità nella fase dello sviluppo.

Condizioni di stabulazione e alimentazione

8. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve mantenersi intorno al 50-60 %; in ogni caso non è inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale, con un fotoperiodo di 12:12 (luce/buio). È anche possibile invertire il fotoperiodo prima dell'accoppiamento e per tutta la durata dello studio, al fine di verificare gli endpoint funzionali e comportamentali durante il periodo di oscurità (con luce rossa), ossia nel periodo di normale attività degli animali (22). Qualsiasi modifica del fotoperiodo deve prevedere un periodo di acclimatazione sufficiente perché gli animali possano adattarvisi. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua da bere. È necessario indicare nella relazione il tipo di cibo e d'acqua e analizzare entrambi per ricercare la presenza di contaminanti.

▼M5

9. Gli animali possono essere alloggiati individualmente o in piccoli gruppi dello stesso sesso. L'accoppiamento va effettuato in gabbie adeguate allo scopo. Dopo che è stata comprovata l'avvenuta copulazione oppure al più tardi il 15° giorno di gestazione, le femmine fecondate sono alloggiate separatamente in gabbie apposite per il parto o la gestazione. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Quando si avvicina il momento del parto occorre fornire alle femmine gravide materiale specifico adatto per la preparazione del nido. È noto che una manipolazione inadeguata o condizioni di stress durante la gravidanza possono provocare effetti indesiderati, compreso un aborto o uno sviluppo fetale o postnatale alterato. Per evitare la mortalità fetale dovuta a fattori che non dipendono dall'esposizione alla sostanza in esame, gli animali vanno maneggiati con cautela durante la gravidanza, evitando di sottoporli a stress causato da fattori esterni, come ad esempio l'eccessivo rumore.

Preparazione degli animali

10. Si utilizzano animali sani, che siano stati acclimatati alle condizioni di laboratorio e non siano stati sottoposti a precedenti procedure sperimentali, a meno che lo studio faccia parte di un altro studio (cfr. paragrafo 3). Gli animali sperimentali devono essere caratterizzati sotto il profilo di specie, ceppo, provenienza, sesso, peso ed età. Ogni animale riceve un numero di identificazione unico, con il quale viene marchiato. Gli animali di tutti i gruppi sperimentali devono essere, per quanto possibile, uniformi per età e peso e rientrare nella gamma normale di valori della specie e del ceppo studiati. Per ciascun livello di dose si utilizzano giovani femmine adulte nullipare. I fratelli e le sorelle non vanno fatti accoppiare e occorre prendere precauzioni in tal senso. Il giorno di gestazione (GG) 0 è quello in cui si osserva un tappo vaginale e/o la presenza di sperma. Quando si acquistano da un fornitore femmine gravide di cui è nota l'età gestazionale, si deve prevedere un periodo adeguato di acclimatazione (ad esempio, 2-3 giorni). Le femmine fecondate sono assegnate a caso ai gruppi di controllo e di trattamento in modo da risultare, nella misura del possibile, in egual numero in ciascun gruppo (ad esempio, per ottenere una distribuzione uniforme, si raccomanda di utilizzare una procedura casuale stratificata, come quella basata sul peso corporeo). Anche il numero di femmine fecondate dallo stesso maschio deve essere uniforme nei vari gruppi.

PROTOCOLLO

Numero e sesso degli animali

11. In ciascun gruppo di trattamento e di controllo il numero di femmine gravide da esporre alla sostanza in esame deve essere sufficiente a garantire che i discendenti siano in numero adeguato a valutare la neurotossicità. Si raccomandano 20 nidiate per ciascun livello di dose. È possibile utilizzare modelli di somministrazione delle dosi con repliche e a gruppi scaglionati se si raggiunge il numero totale previsto di nidiate per gruppo e se si utilizzano modelli statistici adatti a tenere conto delle repliche.

12. Al più tardi il quarto giorno dalla nascita (PND 4, il giorno del parto corrisponde a PND 0) occorre regolare le dimensioni delle nidiate eliminando in modo aleatorio i piccoli in eccesso, in modo da portare tutte le nidiate a numero uguale (23), avendo cura che ciascuna di esse non superi la dimensione media della nidiata per il ceppo di roditori utilizzato (8-12). Ogni nidiata deve contenere, nella misura del possibile, lo stesso numero di maschi e femmine. Non è ammessa l'eliminazione selettiva dei piccoli, ad esempio, in base al peso corporeo. Dopo la standardizzazione delle nidiate (mediante eliminazione dei piccoli soprannumerari) e prima di analizzare gli endpoint funzionali, occorre identificare in modo univoco, con metodi non cruenti (cfr. nota 24), ogni piccolo che si prevede di sottoporre a prove pre o post svezzamento.

▼M5

Assegnazione degli animali alle prove funzionali e comportamentali, alla determinazione del peso del cervello e alla valutazione neuropatologica

13. Il presente metodo di prova consente di scegliere in vari modi gli animali esposti in utero e via allattamento da destinare alle prove funzionali e comportamentali, agli esami della maturazione sessuale, alla determinazione del peso del cervello e alla valutazione neuropatologica (25). È possibile aggiungere altre prove sulla funzione neurocomportamentale (ad esempio, il comportamento sociale), sulla neurochimica o sulla neuropatologia, valutando caso per caso e a condizione che non sia compromessa l'integrità delle prove originariamente richieste.

14. In ogni gruppo-dose si scelgono i piccoli da assegnare alle prove per l'esame degli endpoint a partire dal quarto giorno dopo la nascita (PND 4). La selezione dei piccoli deve essere effettuata in modo che, per quanto possibile, in tutte le prove siano egualmente rappresentati entrambi i sessi di ciascuna nidiata in ciascun gruppo-dose. Nella prova dell'attività motoria si deve esaminare la stessa coppia di maschi e femmine in tutte le fasce di età anteriori allo svezzamento (cfr. punto 35). Per tutte le altre prove, si può destinare alle varie prove comportamentali la stessa coppia o coppie diverse. È talvolta necessario destinare piccoli diversi alle prove della funzione cognitiva in cui si mettono a confronto animali appena svezzati e adulti, per evitare di confondere nelle misurazioni gli effetti dovuti all'età e quelli riconducibili all'esperienza acquisita (26)(27). Al momento dello svezzamento (PND 21), i piccoli che non sono selezionati per le prove possono essere sacrificati con metodi non cruenti. Le eventuali modifiche dell'assegnazione dei piccoli devono essere indicate nella relazione. L'unità statistica di misura è la nidiata (o la madre) e non il figlio.

15. Vi sono diversi modi per assegnare i piccoli agli esami pre e post svezzamento, alle prove cognitive, agli esami patologici ecc. (cfr. figura 1 per lo schema generale e appendice 1 per alcuni esempi di assegnazione). Di seguito è indicato il numero minimo consigliato di animali in ciascun gruppo-dose per gli esami pre e post svezzamento:

Osservazioni cliniche e peso corporeo	Tutti gli animali
Osservazioni cliniche dettagliate	20/sesso (1/sesso/nidiata)
Peso del cervello (post fissazione) PND 11-22	10/sesso (1/nidiata)
Peso del cervello (non fissato) ~ PND 70	10/sesso (1/nidiata)
Neuropatologia (fissazione per immersione o perfusione) PND 11-22	10/sesso (1/nidiata)
Neuropatologia (fissazione per perfusione) PND ~70	10/sesso (1/nidiata)
Maturazione sessuale	20/sesso (1/sesso/nidiata)
Altri indicatori di sviluppo (facoltativo)	Tutti gli animali
Ontogenesi comportamentale	20/sesso (1/sesso/nidiata)
Attività motoria	20/sesso (1/sesso/nidiata)
Funzione motoria e sensoriale	20/sesso (1/sesso/nidiata)
Apprendimento e memoria	10/sesso ([a]) (1/nidiata)

([a]) Secondo la sensibilità delle prove della funzione cognitiva, può essere necessario esaminare un numero maggiore di animali, ad esempio, 1 maschio e 1 femmina per nidiata (per l'assegnazione degli animali alle prove, si veda l'appendice 1). Per ulteriori indicazioni sulle dimensioni del campione, si veda il documento d'orientamento dell'OCSE 43 (8).

▼M5

Dosaggio

16. Si utilizzano almeno tre diversi livelli di dose e un controllo parallelo. La somministrazione dei vari livelli di dose deve essere distanziata in modo che gli effetti tossici siano graduali. A meno che non vi siano limiti imposti dalla natura fisico-chimica o dalle proprietà biologiche della sostanza chimica in esame, si sceglie come dose più elevata il livello che induce un certo grado di tossicità nella madre (che si manifesta, ad esempio, in segni clinici, rallentamento dell'aumento del peso — non superiore al 10 % — e/o segnali evidenti di tossicità dose-limitante in un organo bersaglio). La dose più elevata non deve essere superiore a 1 000 mg per kg di peso corporeo al giorno, con qualche eccezione, ad esempio, nel caso in cui l'esposizione umana prevista alla sostanza in esame indichi la necessità di utilizzare una dose maggiore. In alternativa, è possibile determinare il dosaggio massimo da utilizzare per ottenere una tossicità minima nella madre mediante studi pilota o studi preliminari di definizione del range di dosi. Se la sostanza chimica in esame si è dimostrata tossica per lo sviluppo in uno studio standard di tossicità per lo sviluppo o in uno studio pilota, il livello più elevato dovrà essere la dose massima priva di effetti tossici eccessivi nella progenie — né morte in utero o neonatale, né malformazioni — che precluderebbero una valutazione significativa della neurotossicità. Il livello di dose minimo deve mirare a non produrre alcun segno di tossicità, in particolare di neurotossicità, nella madre o nella fase dello sviluppo. Occorre selezionare una sequenza decrescente di livelli di dose al fine di evidenziare eventuali relazioni dose-effetto e stabilire il livello fino al quale non si osservano effetti dannosi (NOAEL), oppure le dosi prossime al limite di rivelabilità che consentano di determinare una dose di riferimento. L'intervallo ottimale tra dosi consecutive è definito da un fattore compreso fra due e quattro; spesso è preferibile aggiungere un quarto gruppo sperimentale per evitare intervalli molto ampi (ad esempio, di un fattore di oltre il 10).

17. I livelli di dose vanno selezionati tenendo conto degli eventuali dati esistenti sulla tossicità, oltre alle informazioni sul metabolismo e sulla tossicocinetica della sostanza in esame o di materiali ad essa correlate. Tali dati possono contribuire altresì a dimostrare l'adeguatezza dello schema di somministrazione delle dosi. La somministrazione diretta delle dosi ai piccoli va ponderata in funzione delle informazioni relative all'esposizione e ai dati farmacocinetici (28)(29). Prima di condurre studi che prevedono la somministrazione diretta a cuccioli occorre valutarne attentamente i pro e i contro (30).

18. Il gruppo di controllo parallelo deve essere trattato con un placebo oppure, se si utilizza un mezzo disperdente per somministrare la sostanza esame, trattato col solo mezzo disperdente. A tutti gli animali deve di norma essere somministrato lo stesso volume di sostanza o di mezzo disperdente in base al peso corporeo. In caso venga utilizzato un mezzo disperdente o un altro additivo per facilitare la somministrazione delle dosi, occorre tenere conto delle seguenti caratteristiche del mezzo disperdente o dell'additivo: effetti sull'assorbimento, sulla distribuzione, sul metabolismo o sulla ritenzione della sostanza chimica in esame, effetti sulle sue proprietà chimiche che possono alterarne le caratteristiche tossiche ed effetti sul consumo di cibo o acqua oppure sullo stato nutrizionale degli animali. Il mezzo disperdente non deve causare effetti che possono interferire con l'interpretazione dello studio, non essere tossico dal punto di vista del neurocomportamento, né incidere sulla riproduzione o sullo sviluppo. Per quanto riguarda i nuovi veicoli, oltre al gruppo di controllo trattato con il solo mezzo disperdente, è necessario includere un gruppo di controllo trattato con un placebo. Gli animali del o dei gruppi di controllo devono essere manipolati esattamente come quelli dei gruppi esposti alla sostanza in esame.

▼M5

Somministrazione delle dosi

19. La via di esposizione attraverso cui somministrare la sostanza chimica in esame o il mezzo disperdente è scelta in funzione della potenziale via d'esposizione umana e in base alle informazioni disponibili sul metabolismo e sulla distribuzione negli animali sperimentali. La via di somministrazione è in genere orale (ad esempio, mediante una sonda gastrica, la dieta o l'acqua da bere), ma sono ammesse anche altre vie (ad esempio, cutanea o per inalazione), in base alle caratteristiche e alle vie di esposizione umana note o prevedibili [per ulteriori informazioni, si veda il documento di orientamento 43 (8)]. È necessario giustificare la scelta della via di somministrazione. La sostanza in esame va somministrata ogni giorno all'incirca alla stessa ora.

20. Di norma la dose somministrata ai singoli animali si calcola in base all'ultima determinazione del peso corporeo individuale. Occorre tuttavia regolare con grande attenzione le dosi durante l'ultimo trimestre di gravidanza. Le madri in cui si dovessero osservare effetti di eccessiva tossicità vanno soppresse con metodi non cruenti.

21. La sostanza in esame o il mezzo disperdente sono somministrati alle femmine fecondate almeno una volta al giorno, dal momento dell'impianto (GD 6) fino a tutto il periodo della lattazione (PND 21), affinché i figli siano esposti alla sostanza durante lo sviluppo neurologico pre e postnatale. L'età alla quale iniziare a somministrare le dosi, così come la durata e la frequenza della somministrazione, possono essere modificate se emergono elementi comprovanti che un altro disegno sperimentale corrisponde meglio all'esposizione umana. Se si utilizzano altre specie occorre regolare la durata della somministrazione per garantire un'esposizione durante tutti i periodi iniziali di sviluppo del cervello (vale a dire, equivalenti alla crescita prenatale e postnatale iniziale del cervello umano). La somministrazione può cominciare all'inizio della gestazione (GD 0), sebbene sia opportuno tener conto del fatto che la sostanza in esame può provocare la perdita dell'embrione prima dell'impianto. Questo rischio può essere evitato iniziando la somministrazione al sesto giorno (GD 6), scelta che però esclude dal trattamento le fasi di sviluppo comprese tra il GD 0 e 6. Quando il laboratorio acquista animali già fecondati, è impossibile iniziare il trattamento il GD 0, nel qual caso il GD 6 è una buona soluzione per la scelta del giorno di inizio della somministrazione. Il laboratorio decide lo schema di somministrazione delle dosi in base alle informazioni di cui dispone sugli effetti della sostanza in esame, alla propria esperienza e a considerazioni di tipo logistico, che possono anche portare a prolungare la somministrazione fin dopo lo svezzamento. È necessario interrompere la somministrazione il giorno del parto nelle femmine che non hanno ancora dato alla luce tutti i figli. In genere si ritiene che la progenie sia esposta attraverso il latte materno; si deve, tuttavia, considerare l'esposizione diretta dei piccoli se non è comprovata la loro esposizione continua. Prove dell'esposizione continua possono essere ricavate da, ad esempio, informazioni farmacocinetiche, tossicità nella progenie oppure modifiche dei biomarcatori (28).

OSSERVAZIONI

Osservazioni sulle madri

22. Tutte le madri sono accuratamente esaminate almeno una volta al giorno per verificare le condizioni di salute, comprese la morbilità e la mortalità.

23. Durante i periodi di trattamento e di osservazione si devono effettuare periodicamente esami clinici più approfonditi (almeno due volte nel periodo di somministrazione durante la gestazione e due volte nel periodo di somministrazione durante la lattazione), utilizzando almeno dieci madri per ogni livello di dose. L'osservazione è eseguita, fuori dalla gabbia di stabulazione, da tecnici specializzati che non conoscono il trattamento cui sono sottoposti gli animali e applicano protocolli standard per ridurre al minimo lo stress degli animali, limitare il più possibile il condizionamento dell'osservatore e massimizzare l'attendibilità tra osservatori. Ove possibile, è preferibile che le osservazioni in un determinato studio siano effettuate dallo stesso tecnico.

▼M5

24. I segni osservati devono essere riportati nella relazione, specificandone anche l'entità, ogniqualvolta sia possibile. Tra le osservazioni cliniche devono rientrare tutte le alterazioni della cute, del pelo, degli occhi e delle mucose, la comparsa di secrezioni e l'attività autonomica (ad esempio lacrimazione, piloerezione, ampiezza pupillare, ritmo respiratorio insolito e/o respirazione attraverso la bocca, anomalie nella minzione o nella defecazione).

25. Deve essere indicata nella relazione anche ogni risposta inusuale riguardante la posizione del corpo, il livello di attività (ad esempio maggiore o minore esplorazione della zona standard) e la coordinazione dei movimenti. Devono essere inoltre registrate le modificazioni dell'andatura (ad esempio andatura anserina, atassia), della postura (ad esempio gobba) e della reattività alla manipolazione, al posizionamento o ad altri stimoli ambientali, come pure la presenza di movimenti clonici o tonici, convulsioni o tremori, stereotipie (ad esempio toelettatura eccessiva, movimenti inusuali della testa, continuo girare in tondo) o comportamenti insoliti (ad esempio tendenza a mordere o tendenza eccessiva a leccarsi, automutilazione, marcia a ritroso, vocalizzazione) o aggressivi.

26. I segni di tossicità vanno indicati nella relazione, insieme al giorno della loro insorgenza, ora del giorno, grado e durata.

27. Gli animali sono pesati al momento della somministrazione delle dosi almeno una volta alla settimana durante tutto lo studio, il giorno del parto o in prossimità di tale giorno e il giorno dello svezzamento (PND 21). Negli studi con sonda gastrica le madri sono pesate almeno con cadenza bisettimanale. Le dosi devono essere eventualmente regolate al momento di ogni pesata. Il consumo di cibo va misurato almeno con cadenza settimanale durante la gestazione e la lattazione. Il consumo di acqua va misurato almeno con cadenza settimanale se gli animali sono esposti alla sostanza in esame attraverso l'acqua.

Osservazioni sulla progenie

28. Tutta la progenie è esaminata accuratamente almeno una volta al giorno per rilevare i segni di tossicità e determinare la morbilità e la mortalità.

29. Durante i periodi di trattamento e di osservazione si devono effettuare esami clinici più approfonditi. L'osservazione della progenie (almeno un piccolo/sesso/nidiata) è eseguita da tecnici specializzati che non conoscono il trattamento cui sono sottoposti gli animali e applicano protocolli standard per ridurre al minimo il condizionamento dell'osservatore e massimizzare l'attendibilità tra osservatori. Ove possibile, è preferibile che le osservazioni siano effettuate dallo stesso tecnico. Si controllano almeno gli effetti descritti nei paragrafi 24 e 25, applicabili alla fase di sviluppo in osservazione.

30. Tutti i segni di tossicità vanno indicati nella relazione, insieme al giorno della loro insorgenza, ora del giorno, grado e durata.

Indicatori fisici e dello sviluppo

31. I cambiamenti degli indicatori dello sviluppo prima dello svezzamento (quali il dispiegamento del padiglione auricolare, l'apertura degli occhi, l'eruzione degli incisivi) sono strettamente correlati al peso corporeo (30)(31), che può pertanto costituire il miglior indicatore dello sviluppo fisico. La misurazione degli indicatori di sviluppo è consigliabile quindi solo quando è comprovata l'utilità di tali dati. Il calendario per la verifica di questi parametri è indicato nella tabella 1. In funzione degli effetti previsti e dei risultati delle misurazioni iniziali, può essere consigliabile aggiungere altre date o effettuare le misurazioni in altre fasi dello sviluppo.

▼M5

32. Quando si esamina lo sviluppo fisico è preferibile riferirsi all'età postcoitale anziché a quella postnatale (33). Se la progenie è sottoposta a prova il giorno dello svezzamento, si raccomanda di eseguire la prova prima dello svezzamento vero e proprio, per evitare che lo stress associato a questo evento falsi la lettura degli effetti. Inoltre, gli esami della progenie da realizzarsi dopo lo svezzamento non si devono effettuare nei due giorni immediatamente successivi.

Tabella 1

Calendario per l'esame degli indicatori fisici e dello sviluppo, e degli endpoint funzionali/comportamentali ([a])

Età / Endpoint	Pre svezzamento ([b])	Adolescenza ([b])	Giovani adulti ([b])
Indicatori fisici e dello sviluppo			
Peso corporeo e osservazioni cliniche	Settimanalmente ([c])	almeno ogni due settimane	almeno ogni due settimane
Peso del cervello	PND 22 ([d])		alla fine
Neuropatologia	PND 22 ([d])		alla fine
Maturazione sessuale	—	se opportuno	—
Altri indicatori dello sviluppo ([e])	se opportuno	—	—
Endpoint funzionali/comportamentali			
Ontogenesi comportamentale	almeno due misurazioni		
Attività motoria (incluso l'adattamento)	1-3 volte ([f])	—	una volta
Funzione motoria e sensoriale	—	una volta	una volta
Apprendimento e memoria	—	una volta	una volta

([a]) Questa tabella indica il numero minimo di misurazioni da eseguire. In funzione degli effetti previsti e dei risultati delle misurazioni iniziali, può essere consigliabile aggiungere altre date (ad esempio, animali vecchi) o effettuare le misurazioni in altre fasi dello sviluppo.

([b]) Si raccomanda di sospendere le prove sulla progenie nei due giorni successivi allo svezzamento (cfr. paragrafo 23). Date consigliate per le prove sugli adolescenti: PND 25 ± 2, per l'apprendimento e la memoria; PND 25 ± 2 per la funzione motoria e sensoriale. Date consigliate per le prove sui giovani adulti: PND 60-70.

([c]) Il peso corporeo deve essere misurato almeno due volte alla settimana quando la sostanza chimica è somministrata direttamente ai piccoli, in modo da regolare le dosi in base al rapido aumento ponderale che caratterizza questa fase.

([d]) Se necessario, la pesatura del cervello e l'esame della neuropatologia possono essere effettuati prima (ad esempio, PND 11) (cfr. paragrafo 39).

([e]) Occorre riportare nella relazione le misurazioni degli altri indicatori dello sviluppo eventualmente considerati oltre al peso corporeo (ad esempio, l'apertura degli occhi) (cfr. paragrafo 31).

([f]) Cfr. paragrafo 35.

33. Si procede alla conta e all'identificazione del sesso dei piccoli vivi, quest'ultima effettuata tramite esame visivo o misurazione della distanza anogenitale (34)(35); ogni piccolo è pesato individualmente alla nascita o immediatamente dopo, almeno una volta alla settimana durante l'allattamento e successivamente almeno una volta ogni due settimane. Per valutare la maturazione sessuale, si determina l'età e il peso corporeo di almeno un maschio e una femmina per lettiera quando si osserva la comparsa dell'apertura vaginale (36) o della separazione prepuziale (37).

▼M5

Ontogenesi comportamentale

34. L'ontogenesi di determinati comportamenti è misurata in almeno un piccolo/sesso/lettiera nel periodo corrispondente all'età prescelta, utilizzando gli stessi piccoli in tutte le date stabilite per le misurazioni e per tutti i comportamenti esaminati. I giorni in cui si effettuano le misurazioni devono essere separati da intervalli regolari per definire se il cambiamento dell'ontogenesi di un determinato comportamento è normale oppure è legato al trattamento (38). Tra i comportamenti di cui si può esaminare l'ontogenesi indichiamo, a titolo di esempio, il riflesso di raddrizzamento, la geotassia negativa e l'attività motoria (38)(39)(40).

Attività motoria

35. L'attività motoria deve essere monitorata (41)(42)(43)(44)(45) nel periodo che precede lo svezzamento e nell'età adulta. Per l'esecuzione delle prove al momento dello svezzamento, cfr. paragrafo 32. La durata della sessione di prova deve essere tale da consentire di dimostrare l'adattamento intra-sessione dei controlli non trattati. È vivamente raccomandato di usare l'attività motoria per esaminare l'ontogenesi comportamentale. In una prova di ontogenesi comportamentale, gli animali utilizzati nelle sessioni di prova prima dello svezzamento devono essere sempre gli stessi. La frequenza delle prove deve essere tale da consentire di esaminare l'ontogenesi dell'adattamento intra-sessione (44). A tale scopo, fino al giorno dello svezzamento incluso, possono essere necessarie tre o più sessioni di prova (ad esempio, PND 13, 17, 21). Si devono poi esaminare gli stessi animali, o altri componenti della stessa nidiata, anche in età adulta verso la fine dello studio (ad esempio, PND 60-70). Se necessario, è possibile aggiungere sessioni di prova in altre date. L'attività motoria va controllata tramite un apparecchio di registrazione automatica, in grado di rilevarne sia l'aumento che la diminuzione (ciò vuol dire che il livello dell'attività di partenza misurata dall'apparecchio non deve essere così basso da escludere la possibilità di rilevarne la diminuzione, né così alto da impedire di rilevarne l'aumento). Tutti gli apparecchi vengono testati secondo protocolli standard per assicurare, nella misura del possibile, l'affidabilità inter-apparecchio e inter-sessione. I diversi gruppi di trattamento devono essere assegnati ai vari apparecchi nel modo più equilibrato possibile. Ogni animale è sottoposto a prova separatamente. I gruppi di trattamento vanno ripartiti sull'arco della giornata per tener conto dei ritmi circadiani di attività. Si cercherà in particolar modo di ridurre al minimo le variazioni delle condizioni sperimentali assicurandosi che non avvengano sistematicamente durante la somministrazione della sostanza. Tra le variabili che possono influire su molte misurazioni del comportamento, ivi compresa l'attività motoria, vi sono il livello sonoro, le dimensioni e la forma della gabbia, la temperatura, l'umidità relativa, l'illuminazione, gli odori, l'uso della gabbia di stabulazione o di una nuova gabbia e le distrazioni legate all'ambiente.

Funzione motoria e sensoriale

36. La funzione motoria e sensoriale deve essere esaminata accuratamente almeno una volta negli animali adolescenti e una volta nei giovani adulti (ad esempio, PND 60-70). Per l'esecuzione delle prove al momento dello svezzamento, cfr. paragrafo 32. Il numero di prove condotte deve essere sufficiente a garantire un campionamento quantitativo adeguato delle modalità sensoriali (ad esempio, somato-sensoriale, vestibolare) e delle funzioni motorie (ad esempio, forza, coordinamento). Alcuni esempi di prove per valutare la funzione motoria e sensoriale: riflesso di spinta estensorio (46), riflesso di raddrizzamento (47)(48), calo del riflesso di trasalimento dopo stimolo sonoro (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54) e potenziali evocati (55).

▼M5

Prove di apprendimento e memoria

37. Una prova di apprendimento associativo e di memoria deve essere condotta dopo lo svezzamento (ad esempio, 25 ± 2 giorni) e nei giovani adulti (PND 60 e oltre). Per l'esecuzione delle prove al momento dello svezzamento, cfr. paragrafo 32. È possibile utilizzare le stesse prove o prove diverse per queste due fasi dello sviluppo. La scelta della o delle prove di apprendimento e memoria nei ratti svezzati e negli adulti è relativamente libera, purché si rispettino due criteri: in primo luogo, l'apprendimento deve essere esaminato osservando il cambiamento che avviene nel corso di ripetute prove o sessioni, oppure, per le prove che comportano un'unica sessione, con riferimento ad una condizione sperimentale che controlla gli effetti non associativi dell'esperienza di apprendimento; in secondo luogo, la o le prove devono includere una misurazione della memoria (a breve o lungo termine), oltre all'apprendimento iniziale (acquisizione), misurazione che però non può essere indicata nella relazione se non è accompagnata dalla misurazione dell'acquisizione ottenuta nella stessa prova. Se la o le prove di apprendimento e memoria dimostrano un effetto della sostanza chimica in esame, si può considerare il ricorso ad altre prove per escludere qualsiasi interpretazione fondata sulle alterazioni delle capacità sensoriali, motivazionali e/o motorie. Oltre a questi due criteri, si raccomanda che la scelta della prova di apprendimento e memoria si basi sulla comprovata sensibilità alla classe di sostanze chimiche in esame, sempre che tale informazione sia ricavabile dalla letteratura. Se non lo fosse, tra le prove che soddisfano i criteri summenzionati rientrano le seguenti: evitamento passivo (43)(56)(57), memoria spaziale associata al riconoscimento della posizione (Delayed-Matching-To-Position) per il ratto adulto (58) e per il neonato (59), condizionamento olfattivo (43)(60), labirinto acquatico di Morris (61)(62)(63), labirinto di Biel o Cincinnati (64)(65), labirinto a bracci radiali (66), labirinto a T (43), e acquisizione e ritenzione di un comportamento programmato (26)(67)(68). Altre prove descritte in letteratura si applicano ai ratti svezzati (26)(27) e agli adulti (19)(20).

Esame autoptico

38. Le madri possono essere sottoposte a eutanasia dopo lo svezzamento della progenie.

39. La valutazione neuropatologica della progenie è eseguita sui tessuti degli animali soppressi con metodi non cruenti al ventiduesimo giorno dalla nascita (PND 22) o prima, in un giorno compreso tra PND 11 e PND 22, e al termine dello studio. I tessuti da esaminare negli animali sacrificati fino al PND 22 sono quelli cerebrali, mentre negli animali sacrificati alla fine sono sia i tessuti del sistema nervoso centrale (Snc) sia quelli del sistema nervoso periferico (SNP). Gli animali sacrificati il PND 22 o prima possono essere fissati per immersione o perfusione. Gli animali sacrificati al termine dello studio sono fissati per perfusione. Tutti gli aspetti della preparazione dei campioni tissutali, dalla perfusione degli animali alla dissezione dei campioni di tessuto, al trattamento dei tessuti, alla colorazione dei vetrini, devono seguire un modello sperimentale equilibrato, in cui ciascun lotto contiene una quantità di campioni rappresentativi di ogni gruppo-dose. Informazioni supplementari sulla neuropatologia si trovano nel documento di orientamento dell'OCSE n. 20 (9), e anche in (103).

Trattamento dei campioni di tessuto

40. Si registrano tutte le anomalie macroscopiche osservate al momento dell'autopsia. I campioni di tessuto prelevati devono essere rappresentativi di tutte le regioni principali del sistema nervoso. Vanno conservati in un fissativo adatto e trattati in base a protocolli istologici standard pubblicati (69)(70)(71)(103). L'inclusione in paraffina per i tessuti del sistema nervoso centrale e di quello periferico è indicata, ma l'uso di osmio nella post fissazione oppure l'inclusione in una resina sintetica possono risultare mezzi

▼M5

più adatti quando è richiesto un grado più alto di risoluzione (ad esempio, per nervi periferici, qualora si sospetti una neuropatia periferica, e/o per l'analisi morfometrica dei nervi periferici). I tessuti cerebrali prelevati ai fini dell'analisi morfometrica devono essere inclusi in un mezzo adatto, simultaneamente per tutti i livelli di dose, per evitare la coartazione, artefatto che può insorgere durante la conservazione prolungata nel fissativo (6).

Esame neuropatologico

41. Le finalità dell'esame qualitativo sono le seguenti:

i) individuare le regioni del sistema nervoso che presentano segni inequivocabili di alterazioni neuropatologiche,

ii) individuare i tipi di alterazioni neuropatologiche derivanti dall'esposizione alla sostanza chimica in esame; e

iii) determinare la gravità delle alterazioni neuropatologiche.

La ricerca delle alterazioni neuropatologiche è effettuata da un patologo debitamente formato mediante esame al microscopio di sezioni istologiche rappresentative dei campioni di tessuto. Ogni alterazione deve essere classificata assegnandole un livello di gravità soggettivo. Una colorazione con ematossilina ed eosina spesso è sufficiente per esaminare le sezioni cerebrali degli animali sacrificati il PND 22 o prima. Tuttavia, per le sezioni dei tessuti del sistema nervoso centrale e periferico prelevati da animali sacrificati al termine dello studio è raccomandata una colorazione per l'evidenziazione della mielina (ad esempio, luxol fast blu o cresil violetto) e un'impregnazione argentica (ad esempio, metodi di Bielschowsky o di Bodian). Spetta al patologo, in base alla propria esperienza e alla natura delle alterazioni osservate, decidere se utilizzare altre colorazioni per individuare e caratterizzare tipi di alterazioni particolari [ad esempio, proteina acida fibrillare della glia o istochimica della lectina per verificare le alterazioni gliali e microgliali (72), fluoro-jade per rilevare le necrosi (73) (74) o impregnazioni argentiche specifiche per le degenerazioni neurali (75)].

42. È utile eseguire una valutazione morfometrica (quantitativa), poiché i dati che se ne ricavano possono servire a rilevare un effetto causato dal trattamento e ad interpretare le differenze di peso o morfologia del cervello ascrivibili al trattamento (76)(77). Si prelevano campioni di tessuto nervoso e li si prepara per la valutazione morfometrica, che può consistere, ad esempio, in misurazioni lineari e della superficie di determinate regioni del cervello (78). Entrambe queste misurazioni si praticano su sezioni omologhe attentamente selezionate in base a indicatori microscopici affidabili (6). Il ricorso alla stereologia è utile per identificare gli effetti del trattamento su parametri quali il volume o il numero di cellule di determinate regioni neuroanatomiche (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. L'esame cerebrale è teso a individuare qualsiasi segno manifesto di alterazioni neuropatologiche dovute al trattamento, su campioni prelevati all'uopo da tutte le principali regioni cerebrali (ad esempio, bulbi olfattivi, corteccia cerebrale, ippocampo, gangli basali, talamo, ipotalamo, mesencefalo — tetto, tegmento e peduncoli cerebrali -, ponte, midollo allungato, cervelletto), in modo da garantire un esame il più completo possibile. È importante che le sezioni siano prelevate nello stesso piano in tutti gli animali. Negli adulti sottoposti ad eutanasia al termine dello studio si prelevano sezioni rappresentative del midollo spinale e del sistema nervoso periferico. Le zone esaminate devono comprendere l'occhio, con il nervo ottico e la retina, il midollo spinale a livello del rigonfiamento lombare e di quello cervicale, le fibre della radice dorsale e ventrale, il nervo sciatico prossimale, il nervo tibiale prossimale (a livello del ginocchio) e la ramificazione del nervo tibiale a livello dei muscoli del polpaccio. Per il midollo spinale e il nervo periferico, le sezioni devono essere sia trasversali che longitudinali.

▼M5

44. La valutazione neuropatologica deve includere la ricerca di segni di danni a carico del sistema nervoso (6)(85)(86)(87)(88)(89), come pure di alterazioni cellulari (quali vacuolizzazione neuronale, degenerazioni, necrosi) e modificazioni tissutali (quali gliosi, infiltrazione leucocitaria, formazione di cisti). A questo proposito, è importante distinguere gli effetti dovuti al trattamento dagli eventi normali dello sviluppo che notoriamente avvengono nella fase corrispondente all'età dell'animale al momento del sacrificio (90). Di seguito si elencano, a titolo illustrativo, alcune alterazioni significative che sono indice di danno verificatosi nel corso dello sviluppo:

— alterazioni delle dimensioni macroscopiche o della forma dei bulbi olfattivi, del cervello o del cervelletto,

— alterazioni delle dimensioni relative di varie regioni del cervello, in particolare aumento o diminuzione dovuti alla perdita o alla persistenza di popolazioni normalmente transitorie di cellule o a proiezioni assonali (ad esempio, strato germinativo esterno del cervelletto, corpo calloso),

— alterazioni della proliferazione, migrazione e differenziazione, rivelate da zone di apoptosi o necrosi eccessiva, popolazioni raggruppate o disperse di neuroni mal orientati o malformati oppure alterazioni delle dimensioni relative di vari strati delle strutture corticali,

— alterazioni dei modelli di mielinizzazione, in particolare la riduzione delle dimensioni complessive delle strutture mielinate o modifica della loro colorazione,

— segni manifesti di idrocefalia, in particolare ingrossamento dei ventricoli, stenosi dell'acquedotto di Silvio e assottigliamento degli emisferi cerebrali.

Analisi della relazione tra le alterazioni neuropatologiche e la dose

45. Il seguente protocollo è raccomandato per le analisi neuropatologiche qualitative e quantitative. Si inizia col mettere a confronto le sezioni del gruppo trattato con la dose elevata e quelle del gruppo di controllo. Se non si riscontrano alterazioni neuropatologiche negli animali del gruppo trattato con la dose elevata, non occorre effettuare ulteriori analisi. In caso contrario, si procede all'esame degli animali trattati con le dosi intermedie e basse. Se lo studio sul gruppo trattato con la dose elevata è interrotto a causa del decesso degli animali o di effetti tossici di diversa natura non associati alla sostanza in esame, si ricercano allora alterazioni neuropatologiche nei gruppi trattati con le dosi intermedie e basse. Se si rilevano segni di neurotossicità nei gruppi trattati con le dosi più basse, occorre sottoporre questi gruppi all'analisi neuropatologica. Se dall'esame qualitativo e quantitativo risultano alterazioni neuropatologiche dovute al trattamento, occorre determinare in che misura l'incidenza, la frequenza e il livello di gravità delle lesioni o delle alterazioni morfometriche dipendono dalla dose (dose-dipendenza), in base alla valutazione di tutti gli animali di tutti i gruppi trattati. Tutte le regioni del cervello che presentano qualsiasi segno di alterazione neuropatologica devono essere incluse in questa valutazione. Occorre descrivere, per ciascun tipo di lesione, le caratteristiche su cui si basano i diversi livelli di gravità, indicando i criteri utilizzati per distinguerli. Si registra la frequenza e il livello di gravità di ciascun tipo di lesione e si effettua un'analisi statistica per valutare la natura della relazione dose-risposta. Si raccomanda l'uso di vetrini codificati (91).

DATI E RELAZIONE

Dati

46. I dati, riferiti separatamente e riassunti sotto forma di tabella, devono indicare per ogni singolo gruppo sperimentale i tipi di alterazioni e il numero delle madri, dei discendenti per sesso e delle nidiate che presentano ciascun tipo di alterazione. Se è stata eseguita un'esposizione diretta postnatale della progenie, occorre indicare la via, la durata e il periodo di esposizione.

▼M5

Analisi e interpretazione dei risultati

47. L'obiettivo di uno studio della neurotossicità nella fase dello sviluppo è di fornire informazioni sugli effetti dell'esposizione ripetuta a una sostanza chimica durante lo sviluppo in utero e nella fase iniziale postnatale. Poiché lo studio evidenzia sia la tossicità generale che gli endpoint di tossicità per lo sviluppo, i risultati consentiranno di distinguere gli effetti sul neurosviluppo che si verificano in assenza di tossicità materna generale da quelli indotti solo da livelli che risultano tossici anche per le madri. La complessità delle interrelazioni tra il disegno sperimentale, l'analisi statistica e la significatività biologica dei dati esige che l'interpretazione dei dati sulla neurotossicità nella fase dello sviluppo sia avvalorata da un parere specialistico (107)(109). I risultati dello studio devono essere interpretati soppesandone la forza probante (20)(92)(93)(94). Si dovranno discutere gli eventuali tipi di effetti comportamentali o morfologici riscontrati, così come le prove della relazione dose-risposta. Questa caratterizzazione dovrà includere i dati di tutti gli studi di valutazione della neurotossicità nella fase dello sviluppo, in particolare studi epidemiologici sull'uomo o rapporti di studi di casi e studi su animali sperimentali (ad esempio, dati tossicocinetici, informazioni sulla relazione struttura-attività, dati ottenuti da altri studi di tossicità). Dovrà inoltre essere stabilita la relazione tra le dosi della sostanza chimica in esame e la presenza, l'assenza, l'incidenza e la portata degli eventuali effetti neurotossici per ciascun sesso (20)(95).

48. L'analisi dei dati deve includere una discussione della significatività biologica e statistica. L'analisi statistica non deve determinare l'interpretazione, bensì fungere da strumento che serva a orientarla. L'assenza o la presenza di significatività statistica di per sé non vale a giustificare l'assenza o la presenza di effetti legati al trattamento. Per evitare eventuali falsi negativi e le difficoltà inerenti alla dimostrazione di un risultato negativo, occorre includere nella discussione dei risultati i dati storici di controllo e i dati di controllo positivi, soprattutto quando non si rileva alcun effetto ascrivibile al trattamento (102) (106). La probabilità di ottenere falsi positivi deve essere discussa alla luce dell'analisi statistica generale dei risultati (96). L'analisi deve comprendere l'eventuale relazione tra le alterazioni neuropatologiche e comportamentali osservate.

49. Tutti i risultati devono essere analizzati applicando modelli statistici adatti al disegno sperimentale (108). La scelta di un'analisi parametrica o non parametrica deve essere giustificata non solo tenendo conto di fattori quali la natura dei dati (trasformati e non) e la loro distribuzione, ma anche considerando la solidità relativa dell'analisi statistica utilizzata. L'analisi statistica deve essere scelta in base alla finalità dello studio e al suo disegno sperimentale, in modo da limitare il più possibile errori di tipo I (falsi positivi) e di tipo II (falsi negativi) (96)(97)(104)(105). Se lo studio dello sviluppo utilizza specie multipare nelle quali si sottopongono a prova svariati piccoli per nidiata, il modello statistico deve tenere conto della nidiata, per evitare un eccesso di errori di tipo I (98)(99)(100)(101). L'unità statistica di misura è la nidiata e non il figlio e i modelli sperimentali devono essere concepiti in modo da escludere che piccoli della stessa nidiata siano considerati osservazioni indipendenti. Qualsiasi endpoint misurato varie volte nello stesso soggetto deve essere analizzato mediante modelli statistici che tengano conto della non indipendenza di tali misure.

Relazione sulla prova

50. La relazione deve comprendere i seguenti dati.

Sostanza chimica in esame:

— natura fisica e, ove pertinenti, proprietà fisico-chimiche;

— dati identificativi, compresa la provenienza;

▼M5

— purezza del preparato e impurità note e/o attese.

Mezzo disperdente (se del caso):

— motivazione della scelta del mezzo disperdente, se diverso dall'acqua o da una soluzione salina fisiologica.

Animali sperimentali:

— specie e ceppo utilizzati, e giustificazione se la specie scelta è diversa dal ratto;

— fornitore degli animali sperimentali;

— numero, età all'inizio della prova e sesso degli animali;

— provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, acqua ecc.;

— peso di ciascun animale all'inizio della prova.

Condizioni sperimentali:

— criteri di selezione dei livelli di dose;

— criteri di selezione della via e del periodo di somministrazione delle dosi;

— dosi somministrate, caratteristiche del mezzo disperdente, volume e forma fisica del preparato somministrato;

— informazioni dettagliate sulla formulazione della sostanza chimica in esame/incorporazione nella dieta, sulla concentrazione finale, sulla stabilità e sull'omogeneità del preparato;

— metodo utilizzato per l'identificazione univoca delle madri e della progenie;

— descrizione dettagliata del o dei protocolli di randomizzazione utilizzati per assegnare le madri ai gruppi di trattamento, per selezionare i piccoli da eliminare dalla nidiata e per assegnare quelli restanti ai gruppi sperimentali;

— modalità precise di somministrazione della sostanza chimica in esame;

— se del caso, equivalenza tra la concentrazione della sostanza chimica nel cibo, nell'acqua o inalata, espressa in ppm, e la dose effettiva, espressa in mg/kg di peso corporeo/giorno;

— condizioni ambientali,

— dettagli sul tipo di cibo e acqua (acqua di rubinetto, distillata);

— date di inizio e fine dello studio.

Protocolli di osservazione e protocolli sperimentali:

— descrizione dettagliata dei protocolli utilizzati per standardizzare le osservazioni, accompagnata dalla descrizione dei protocolli e delle definizioni operative impiegati per classificare le osservazioni;

— elenco di tutti i protocolli sperimentali utilizzati e giustificazione della loro scelta;

— descrizione particolareggiata dei protocolli comportamentali/funzionali, patologici, neurochimici o elettrofisiologici utilizzati, comprese informazioni e dettagli sugli apparecchi automatici;

— protocolli di taratura e di garanzia dell'equivalenza degli apparecchi; protocolli utilizzati per garantire la composizione equilibrata dei gruppi sottoposti al trattamento;

— breve motivazione delle decisioni che si fondano sul giudizio professionale.

▼M5

Risultati (individuali e di sintesi, comprese la media e la varianza se del caso):

— numero di animali all'inizio dello studio e numero al termine dello studio;

— numero di animali e nidiate utilizzati in ciascun metodo di prova;

— numero di identificazione di ciascun animale e nidiata di provenienza;

— dimensioni della nidiata e peso medio alla nascita per sesso;

— peso corporeo e variazioni del peso corporeo, compresi peso corporeo finale delle madri e dei figli;

— dati relativi al consumo di cibo e, se del caso, di acqua (ad esempio, se la sostanza chimica in esame viene somministrata con l'acqua);

— dati sulla risposta tossica per sesso e livello di dose, in particolare i segni di tossicità o mortalità, specificando il momento e la causa del decesso, se del caso;

— natura, gravità, durata, giorno di esordio, ora del giorno e successivo decorso delle osservazioni cliniche dettagliate;

— punteggio di ogni indicatore di sviluppo (peso, maturazione sessuale e ontogenesi comportamentale) al momento di ciascuna osservazione;

— descrizione dettagliata di tutte le osservazioni comportamentali, funzionali, neuropatologiche, neurochimiche, elettrofisiologiche per sesso, compresi gli incrementi e i decrementi rispetto ai controlli;

— reperti autoptici,

— peso del cervello

— ogni diagnosi formulata alla luce di lesioni e segni neurologici, ivi comprese malattie o condizioni spontanee;

— immagini di reperti emblematici;

— immagini a debole ingrandimento che consentono di valutare l'omologia delle sezioni utilizzate per la morfometria;

— dati sull'assorbimento e sul metabolismo, compresi dati complementari provenienti da uno studio di tossicocinetica condotto separatamente, se disponibili;

— elaborazione statistica dei risultati, compresi i modelli statistici utilizzati per l'analisi dei dati, e i risultati, indipendentemente dal fatto che siano significativi;

— elenco delle persone che hanno partecipato allo studio, specificandone la formazione professionale.

Discussione dei risultati:

— informazioni sulla relazione dose-risposta, per sesso e gruppo;

— legame tra eventuali altri effetti tossici e le conclusioni circa il potenziale neurotossico della sostanza chimica in esame, per sesso e gruppo;

— ripercussioni delle eventuali informazioni tossicocinetiche sulle conclusioni;

— analogie tra gli effetti osservati e quelli di eventuali sostanze neurotossiche note;

▼M5

— dati a sostegno dell'attendibilità e della sensibilità del metodo di prova (vale a dire, dati storici di controllo e dati di controllo positivi);

— eventuale rapporto tra gli effetti neuropatologici e funzionali;

— NOAEL o dose di riferimento per madri e progenie, per sesso e gruppo.

Conclusioni:

— discussione sull'interpretazione generale dei dati basata sui risultati, che espliciti la conclusione a cui si è giunti, ossia se la sostanza chimica esaminata abbia causato o meno neurotossicità nella fase dello sviluppo, con relativo NOAEL.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Denmark, 13-14 June 1995.

(2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Available: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].

(3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Available: [http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479].

(4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. Environ. Health Perspect., 109:79-91.

(5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Environ. Health Perspect., 109:101-111.

(6) Garman, R.H., Fix,A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. Environ. Health Perspect., 109:93-100.

(7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23-25 October 2000.

(8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. July 2008 Available: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage=en].

(9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Available: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].

(10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol., 12: 173-292.

(11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition,* ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

▼M5

(12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 8:188-197.

(13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, *1st Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

(14) Capitolo B.34 del presente allegato, Saggio di tossicità sulla riproduzione: una generazione.

(15) Capitolo B.35 del presente allegato, Studio di tossicità riproduttiva a due generazioni.

(16) Capitolo B.43 del presente allegato, Studi di neurotossicità nei roditori.

(17) Capitolo B.31 del presente allegato, Studio di tossicità prenatale.

(18) 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).

(19) WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Available: [http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm].

(20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches,* (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Available: [http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm].

(21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods*, *1st Edition*, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.

(22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. Neurotoxicol. Teratol., 19:499-509.

(23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. Fundam. Appl. Toxicol., 38:2-6.

(24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. Lab. Animal Sci., 27:110-112.

(25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. Fundam. Appl. Toxicol., 13:118-136.

(26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.

(27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective.* Academic Press, Orlando.

(28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.

(29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. Int. J. Toxicol., 24:87-94.

(30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. Toxicol. Sci., 49: 1-4.

(31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5 A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Phamaceuticals for Human Use.

(32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. J. Am. Coll. Toxicol., 6:433-439.

▼**M5**

(33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. Neurotoxicol. Teratol., 20:449-457.

(34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. Reprod. Toxicol., 13:383-390.

(35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. Toxicol. Sci., 58:350-365.

(36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:579-586.

(37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol. Reprod., 17:298-303.

(38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. Neurotoxicol. Teratol., 12:489-95.

(39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim. Behav., 23:896-920.

(40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. In: *Handbook of Behavioral Teratology.* Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, pagg. 67-100.

(41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. Neurobehav. Toxicol., 1:53-66.

(42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, pagg. 37-82.

(43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3′-iminodipropionitrile in the rat. Neurotoxicol. Teratol., 15:117-129.

(44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. Dev. Psychobiol., 18:247-260.

(45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13:599-609.

(46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 19:1997. 405-411.

(47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals.Physiol. Behav., 64:661-669.

(48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 40:589-591.

(49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. In: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, pagg. 287-351

(50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. Prog. Neurobiol., 59:107-128.

(51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, pagg. 181-211.

▼**M5**

(52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. J. Am. Coll. Toxicol., 8:199-211.

(53) Crofton, K.M, Lassiter, T.L, Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. Hear. Res.,80:25-30.

(54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 6:437–445.

(55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. pagg. 125-145.

(56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3′-iminopropionitrile. Toxicol. Appl. Pharmacol., 105:321-332.

(57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. Neurosci. Behav. Rev., 6:247-296.

(58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 10:237-244.

(59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. Behav. Neurosci., 103:98-105.

(60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. Develop. Psychobiol., 17:465-479.

(61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods, 11:47-60.

(62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. Int. J. Neurosci., 48:29-69.

(63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res. Rev, 36:60-90.

(64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. Neurotoxicol. Teratol., 9:235-241.

(65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. Drug Chem. Toxicol., 20:387-399.

(66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. Neurotoxicol. Teratol., 10:327-332.

(67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. Toxicol. Appl. Pharmacol., 71:342-352.

(68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. J. Gerontol., 36:338-341.

(69) Fix, A.S, Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. Toxicol. Pathol., 28: 122-131.

(70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, pagg. 84-107.

(71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, London.

▼M5

(72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. Toxicol. Pathol., 24: 291-304.

(73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. Brain Res., 874:123-130.

(74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. Exp. Toxic. Pathol., 53:365-372.

(75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. Neurotoxicol. Teratol., 16, 545-561.

(76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. Environ. Toxicol. Pharmacol., 19:745-755.

(77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'-Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. Reprod. Toxicol., 20:417-432.

(78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. Neurobehav. Toxicol., 1:129–135.

(79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.

(80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 57: 305-310.

(81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. Brain Res., 609: 262-268.

(82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. J. Neurocytol., 26:707-710.

(83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. Trends Neurosci., 22:51-61.

(84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience, 130: 813–831.

(85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). Teratology, 49:113-121.

(86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. Develop. Brain Res., 84:294-298.

(87) Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, pagg. 3-41.

(88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science, 283:70-74.

▼M5

(89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. Science, 287:1056–1060.

(90) Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.

(91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. Toxicol. Let., 63:127-133.

(92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. Environ. Health Perspect., 104:401-405.

(93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644 A.

(94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322.

(95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology.* Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.

(96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. Neurotoxicology, 5:113-126.

(97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. J. Am. Coll. Toxicol., 8:21-27.

(98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. Dev. Psychobiol., 6:329-335.

(99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. Teratology, 12:165-172.

(100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. Neurotoxicol. Teratol., 14: 221-228.

(101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:587-90.

(102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. Neurotoxicol. Teratol., 26:345-352.

(103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today. Toxicol. Pathol. 34:296-313.

(104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. Neurotoxicol. Teratol., 14(3):205-210.

(105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. Biometrics, 41:295-301.

(106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):266-287.

(107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology,* 30(4):288-325.

▼**M5**

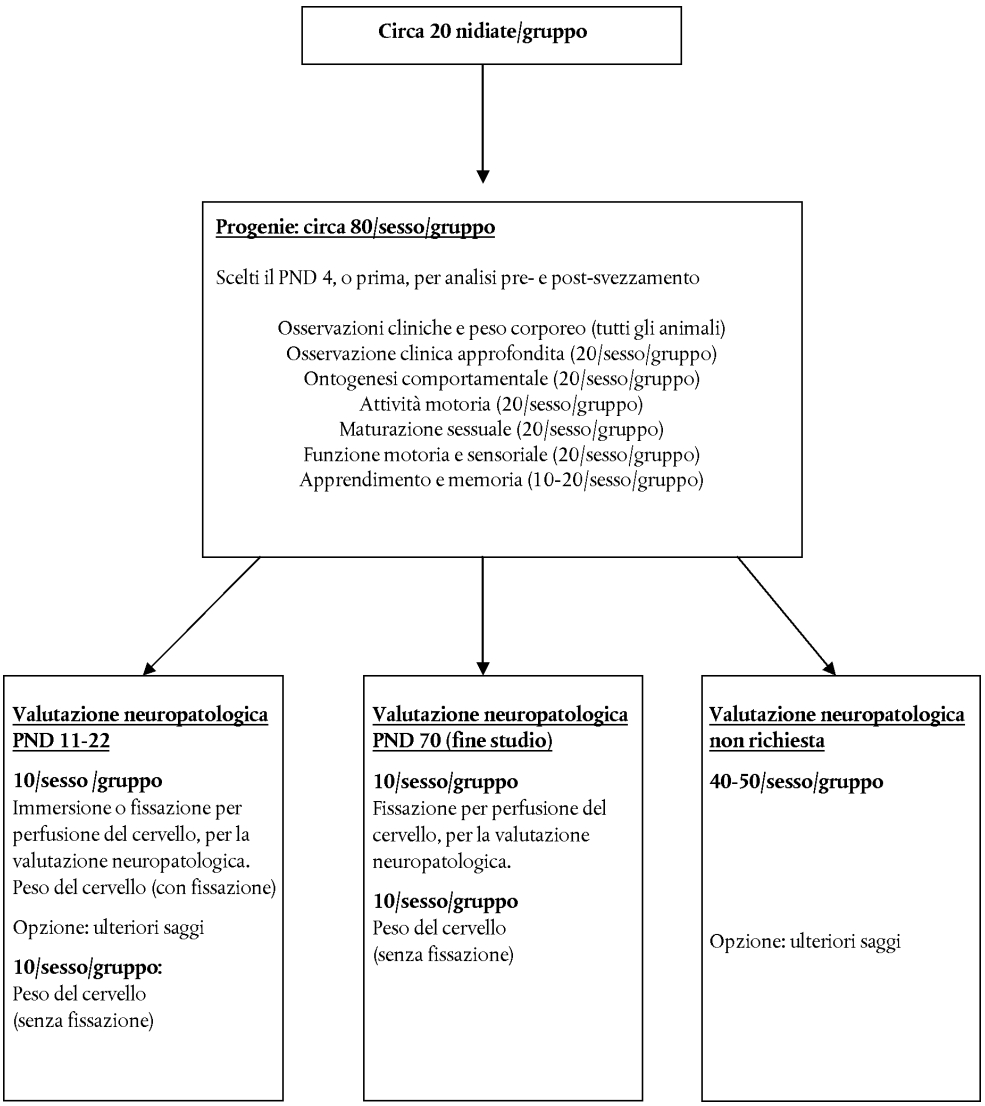
(108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):326-348.

(109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):349-381.

▼M5

Figura 1

Schema generale per le prove funzionali/comportamentali, la valutazione neuropatologica e la determinazione del peso cerebrale. Questo diagramma si basa sulla descrizione di cui ai paragrafi 13-15 (PND = giorno postnatale). Alcuni esempi di suddivisione degli animali sono illustrati nell'appendice 1.



▼**M5**

Appendice 1

1. Questa appendice contiene alcuni esempi di suddivisione degli animali, di cui si dà una descrizione e una sintesi sotto forma di tabella. Sono esempi che servono ad illustrare come l'assegnazione degli animali possa essere effettuata in vari modi nei diversi impianti sperimentali.

Esempio 1

2. Si utilizzano 20 piccoli/sesso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per eseguire le prove pre svezzamento dell'ontogenesi comportamentale. Di questo gruppo, 10 piccoli/sesso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono sacrificati con metodi non cruenti il ventiduesimo giorno dopo la nascita (PND 22). Se ne prelevano i cervelli, che sono poi pesati e preparati per essere sottoposti alla valutazione istopatologica. Si ricavano inoltre i dati ponderali dei cervelli non fissati dei restanti 10 maschi e 10 femmine per livello di dose.

3. Si utilizzano altri 20 animali/sesso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per le prove funzionali/comportamentali post svezzamento (osservazioni cliniche dettagliate, attività motoria, riflesso di trasalimento dopo stimolo sonoro e prove della funzione cognitiva negli adolescenti) e per valutare l'età della maturazione sessuale. Di questi, 10 piccoli/sesso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono anestetizzati e fissati mediante perfusione al termine dello studio (circa PND 70). Dopo un'ulteriore fissazione in situ, il cervello è prelevato e preparato per essere sottoposto a valutazione neuropatologica.

4. Per le prove della funzione cognitiva nei giovani adulti (ad esempio, PND 60-70), si utilizzano ulteriori 20 piccoli/sesso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata). Di questi, 10 piccoli/sesso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono sacrificati al termine dello studio per poi prelevare e pesare il cervello.

5. I restanti 20 animali/sesso/gruppo possono essere utilizzati per eventuali prove supplementari.

Tabella 1

N. animale ([a])		N. piccoli assegnati alla prova	Esame/prova
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Ontogenesi comportamentale
		10 m + 10 f	Peso cervello neuropatologia/ morfometria al PND 22
		10 m + 10 f	Peso cervello al PND 22
2	6	20 m + 20 f	Osservazioni cliniche dettagliate
		20 m + 20 f	Attività motoria
		20 m + 20 f	Maturazione sessuale
		20 m + 20 f	Funzione motoria e sensoriale
		20 m + 20 f	Apprendimento e memoria (PND 25)
		10 m + 10 f	Peso cervello/neuropatologia/ morfometria nei giovani adulti ~PND 70

▼M5

N. animale ([a])		N. piccoli assegnati alla prova	Esame/prova
m	f		
3	7	20 m + 20 f	Apprendimento e memoria (giovani adulti)
		10 m + 10 f	Peso cervello nei giovani adulti ~ PND 70
4	8	—	Animali di riserva per sostituzioni o prove supplementari

([a]) In questo esempio le nidiate sono ridotte a 4 maschi + 4 femmine; i maschi sono numerati da 1 a 4 e le femmine da 5 a 8.

Esempio 2

6. Si utilizzano 20 piccoli/sesso/livello di dose (ad esempio, 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per eseguire le prove pre svezzamento dell'ontogenesi comportamentale. Di questi, 10 piccoli/sesso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono sacrificati con metodi non cruenti l'undicesimo giorno dopo la nascita (PND 11). Se ne prelevano i cervelli, che sono poi pesati e preparati per essere sottoposti alla valutazione istopatologica.

7. Si utilizzano 20 animali/sesso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per le prove post svezzamento (osservazioni cliniche dettagliate, attività motoria, valutazione della maturazione sessuale e della funzione motoria e sensoriale). Di questi, 10 animali/sesso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono anestetizzati e fissati mediante perfusione al termine dello studio (circa PND 70). Dopo un'ulteriore fissazione in situ, il cervello è prelevato, pesato e preparato per essere sottoposto a valutazione neuropatologica.

8. Per le prove sulla funzione cognitiva negli adolescenti e nei giovani adulti si impiegano 10 piccoli/sesso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata). Animali diversi sono utilizzati per le prove sulla funzione cognitiva al PND 23 e allo stadio di giovani adulti. Al termine dello studio i 10 animali/sesso/gruppo sottoposti alle prove da adulti sono sacrificati e il cervello è prelevato e pesato.

9. I restanti 20 animali/sesso/gruppo non selezionati per le prove sono sacrificati ed eliminati al momento dello svezzamento.

Tabella 2

N. animale ([a])		N. piccoli assegnati alla prova	Esame/prova
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Ontogenesi comportamentale
		10 m + 10 f	Peso cervello/neuropatologia/ morfometria al PND 11
2	6	20 m + 20 f	Osservazioni cliniche dettagliate
		20 m + 20 f	Attività motoria
		20 m + 20 f	Maturazione sessuale
		20 m + 20 f	Funzione motoria e sensoriale
		10 m + 10 f	Peso cervello/neuropatologia/ morfometria nei giovani adulti ~PND 70

▼M5

N. animale ([a])		N. piccoli assegnati alla prova	Esame/prova
m	f		
3	7	10 m + 10 f ([b])	Apprendimento e memoria (PND 23)
3	7	10 m + 10 f ([b])	Apprendimento e memoria (giovani adulti) Peso cervello nei giovani adulti
4	8	—	Animali sacrificati ed eliminati al PND 21

([a]) In questo esempio le nidiate sono ridotte a 4 maschi + 4 femmine; i maschi sono numerati da 1 a 4 e le femmine da 5 a 8.
([b]) Piccoli diversi sono impiegati per le prove cognitive al PND 23 e allo stadio di giovani adulti (ad esempio, piccoli in soprannumero nelle nidiate rispetto ai 20 prestabiliti).

Esempio 3

10. Si utilizzano 20 piccoli/sesso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per determinare il peso del cervello e la neuropatologia all'undicesimo giorno (PND 11). Di questi, 10 piccoli/sesso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono sacrificati con metodi non cruenti il PND 11 e i cervelli sono prelevati, pesati e preparati per essere sottoposti alla valutazione istopatologica. Si ricavano inoltre i dati ponderali dei cervelli non fissati dei restanti 10 maschi e 10 femmine per livello di dose.

11. Si utilizzano altri 20 animali/sesso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per le prove di ontogenesi comportamentale (attività motoria), gli esami post svezzamento (attività motoria e valutazione dell'età della maturazione sessuale), e le prove della funzione cognitiva negli adolescenti.

12. Si utilizzano altri 20 animali/sesso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per le prove sulla funzione motoria e sensoriale (riflesso di trasalimento dopo stimolo sonoro) e per osservazioni cliniche dettagliate. Di questi, 10 animali/sesso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono anestetizzati e fissati mediante perfusione al termine dello studio (circa PND 70). Dopo un'ulteriore fissazione in situ, il cervello è prelevato, pesato e preparato per essere sottoposto a valutazione neuropatologica.

13. Si utilizzano ulteriori 20 piccoli/sesso/livello di dose (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) per le prove della funzione cognitiva nei giovani adulti. Di questi, 10 animali/sesso/gruppo (ossia 1 maschio e 1 femmina per nidiata) sono sacrificati al termine dello studio per poi prelevare e pesare il cervello.

Tabella 3

N. animale ([a])		N. piccoli assegnati alla prova	Esame/prova
m	f		
1	5	10 m + 10 f	Peso cervello/neuropatologia/morfometria al PND 11
		10 m + 10 f	Peso cervello al PND 11
2	6	20 m + 20 f	Ontogenesi comportamentale (attività motoria)
		20 m + 20 f	Attività motoria
		20 m + 20 f	Maturazione sessuale
		20 m + 20 f	Apprendimento e memoria (PND 27)

▼**M5**

N. animale ([a])		N. piccoli assegnati alla prova	Esame/prova
m	f		
3	7	20 m + 20 f	Riflesso di trasalimento dopo stimolo sonoro (adolescenti e giovani adulti)
		20 m + 20 f	Osservazioni cliniche dettagliate
		10 m + 10 f	Peso cervello/neuropatologia/ morfometria nei giovani adulti ~PND 70
4	8	20 m + 20 f	Apprendimento e memoria (giovani adulti)
		10 m + 10 f	Peso cervello nei giovani adulti

([a]) In questo esempio le nidiate sono ridotte a 4 maschi + 4 femmine; i maschi sono numerati da 1 a 4 e le femmine da 5 a 8.

▼**M5**

Appendice 2

Definizioni

Sostanza chimica: sostanza o miscela

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

▼M5

B.54. SAGGIO UTEROTROFICO SUI RODITORI: PROVA DI SCREENING A BREVE TERMINE DELLE PROPRIETÀ ESTROGENICHE

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 440 (2007). Nel 1998 l'OCSE ha avviato lavori a carattere altamente prioritario per rivedere le linee guida esistenti ed elaborarne di nuove per lo screening e le prove delle sostanze considerate interferenti endocrini potenziali (1). Tra gli elementi su cui si sono concentrati i lavori figura la messa a punto di una linea guida per il saggio uterotrofico sui roditori. La linea guida è stata poi oggetto di un vasto programma di validazione, che ha incluso la compilazione di un documento di riferimento dettagliato (2)(3) e la realizzazione di intensi studi intra e interlaboratorio, volti a dimostrare la pertinenza e la riproducibilità del saggio eseguito con un potente estrogeno di riferimento, con agonisti deboli dei recettori per gli estrogeni, con un antagonista forte dei recettori per gli estrogeni e con una sostanza chimica di riferimento negativa (4)(5)(6)(7)(8)(9). Il presente metodo di prova B.54 è frutto dell'esperienza acquisita nel corso del programma di validazione e dei risultati ottenuti riguardo agli agonisti degli estrogeni.

2. Il saggio uterotrofico è una prova di screening a breve termine che risale agli anni 30 (27)(28) e che è stata standardizzata per la prima volta nel 1962 a fini di depistaggio da un comitato di esperti (32) (35). Basato sull'aumento del peso uterino, la cosiddetta risposta uterotrofica (cfr. 29), questo metodo valuta la capacità di una sostanza chimica di stimolare un'attività biologica analoga a quella degli agonisti o degli antagonisti degli estrogeni naturali (ad esempio, 17ß-estradiolo), seppure il suo uso per la determinazione degli antagonisti sia molto meno frequente. L'utero risponde agli estrogeni in due modi: inizialmente con un aumento di peso dovuto all'assorbimento di acqua, cui segue un ulteriore aumento causato dalla crescita tissutale (30). La reazione dell'utero nei ratti e nei topi è qualitativamente comparabile.

3. Il presente saggio costituisce una prova di screening in vivo 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» (appendice 2). In questo quadro concettuale, il saggio uterotrofico si colloca nel livello 3 come saggio in vivo che fornisce dati riguardo ad un unico meccanismo endocrino, ovvero l'attività estrogenica.

4. Il saggio uterotrofico è destinato a far parte di una batteria di prove in vitro e in vivo volta ad individuare le sostanze chimiche potenzialmente in grado di interagire con il sistema endocrino, e consentire di valutarne i rischi per la salute umana o per l'ambiente. Nel programma di validazione dell'OCSE sono stati utilizzati agonisti degli estrogeni sia forti che deboli per valutare l'efficacia del metodo nell'individuare le sostanze chimiche estrogeniche (4)(5)(6)(7)(8). È stata quindi dimostrata la sensibilità del protocollo sperimentale agli agonisti degli estrogeni, così come la sua buona riproducibilità intra e interlaboratorio.

5. Per quanto riguarda le sostanze chimiche negative, nel programma di validazione è stata inclusa solo una sostanza chimica di riferimento «negativa» già identificata come tale dal saggio uterotrofico e da saggi in vitro dei recettori e del legame con recettori, ma sono stati valutati dati sperimentali supplementari, esterni al programma di validazione OCSE, che hanno confermato la specificità del saggio uterotrofico per lo screening degli agonisti degli estrogeni (16).

▼**M5**

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

6. Gli agonisti e gli antagonisti degli estrogeni fungono da ligandi dei recettori estrogenici a e b e possono, rispettivamente, attivare o inibire l'azione trascrizionale dei recettori. Dato che ciò può incidere negativamente sulla salute, in particolare sulla riproduzione e sullo sviluppo, è necessario poter esaminare e valutare rapidamente l'eventuale azione agonista o antagonista degli estrogeni esplicata dalle sostanze chimiche. Sebbene apportino informazioni utili, l'affinità di un ligando per un recettore estrogenico oppure l'attivazione della trascrizione di geni reporter in vitro non sono gli unici fattori che determinano un possibile pericolo. Altri determinanti possono essere l'attivazione e la disattivazione metabolica dopo l'ingresso della sostanza chimica nell'organismo, la sua distribuzione nei tessuti bersaglio e l'eliminazione dall'organismo, che dipendono, almeno in parte, dalla via di somministrazione e dalla sostanza stessa. Occorre pertanto indagare l'eventuale attività di una sostanza chimica in vivo, in condizioni idonee, a meno che le sue caratteristiche relative all'assorbimento, alla distribuzione, al metabolismo e all'eliminazione (ADME) non forniscano già le informazioni necessarie. I tessuti dell'utero rispondono con una crescita rapida e vigorosa alla stimolazione con estrogeni, in particolare nei roditori da laboratorio, il cui ciclo estrale ha una durata di circa 4 giorni. I roditori, in particolare il ratto, sono ampiamente utilizzati anche negli studi di tossicità per la caratterizzazione dei pericoli. L'utero dei roditori è pertanto un organo bersaglio adatto per lo screening in vivo degli agonisti e degli antagonisti degli estrogeni.

7. Il presente metodo di prova si basa sui protocolli impiegati nello studio di validazione dell'OCSE che si sono dimostrati affidabili e ripetibili negli studi intra e interlaboratorio (5)(7). Attualmente sono praticabili due metodi: l'uno che utilizza femmine adulte ovariectomizzate e l'altro che utilizza femmine immature non ovariectomizzate. Nel programma di validazione delle prove dell'OCSE si è visto che entrambi i metodi possiedono sensibilità e riproducibilità analoghe. Tuttavia, il metodo con femmine immature, il cui asse ipotalamo-ipofisario-ovarico (HPG) è intatto, è forse meno specifico ma copre un campo di investigazione più vasto rispetto al metodo che utilizza animali ovariectomizzati, perché è sensibile alle sostanze chimiche che interagiscono con l'asse HPG e non soltanto a quelle che interagiscono con i recettori degli estrogeni. Nel ratto l'asse HGP è funzionale a partire circa dal 15^{o} giorno successivo alla nascita. Prima di questa fase, la pubertà non può essere accelerata, somministrando, ad esempio, GnRH. Con l'approssimarsi della pubertà, prima dell'apertura vaginale, la femmina avrà diversi cicli silenti, senza apertura vaginale o ovulazione ma con alcune fluttuazioni ormonali. Se una sostanza chimica stimola direttamente o indirettamente l'asse HPG, si avrà pubertà precoce, ovulazione precoce e apertura vaginale accelerata. L'accelerazione della crescita e dell'apertura vaginale è stimolata non solo dalle sostanze chimiche che agiscono sull'asse HPG, ma anche da alcuni regimi alimentari con livelli di energia metabolizzabile più alti della norma senza essere estrogenici. Queste sostanze non inducono una risposta uterotrofica nelle femmine adulte ovariectomizzate perché il loro asse HPG non funziona.

8. In un'ottica di attenzione al benessere degli animali, il metodo da preferirsi è quello che utilizza ratti immaturi, evitando in tal modo il pretrattamento chirurgico e il rischio di non poter utilizzare gli animali che manifestano segni di pre-estro (cfr. paragrafo 30).

▼M5

9. La risposta uterotrofica non è esclusivamente di origine estrogenica, ma può essere stimolata anche da sostanze chimiche diverse dagli agonisti o dagli antagonisti degli estrogeni. Ad esempio, dosi relativamente elevate di progesterone e testosterone o di varie progestine sintetiche possono anch'esse indurre una stimolazione (30). Qualsiasi risposta può essere oggetto di un esame istologico volto a rilevare tessuti vaginali cheratinizzati e corneificati (30). A prescindere dalla possibile origine della risposta, l'esito positivo di un saggio uterotrofico deve di norma essere seguito da ricerche più approfondite. L'attività estrogenica può essere confermata da prove in vitro, come i saggi di legame ai recettori estrogenici e i saggi di attivazione della trascrizione, o da altri saggi in vivo come quello della pubertà nelle femmine.

10. Fermo restando che il saggio uterotrofico costituisce una prova di screening in vivo, il metodo adottato per la sua convalida ha tenuto conto del benessere degli animali e si configura come una strategia di prove in sequenza. A tal fine, i lavori sono stati diretti principalmente a convalidare con rigore la riproducibilità e la sensibilità del depistaggio dell'attività estrogenica (il problema maggiore posto da molte sostanze chimiche), mentre solo alcuni sono stati dedicati alla componente antiestrogenica della prova. È stato testato un solo potente antiestrogeno, poiché il numero di sostanze chimiche dotate di un chiaro profilo antiestrogenico (non confuso da una qualche attività estrogenica) è molto limitato. Il presente metodo di prova è quindi destinato al protocollo estrogenico, mentre il protocollo che descrive il modo antagonista della prova è illustrato in un documento di orientamento (37). Per quanto riguarda le sostanze chimiche che esplicano un'attività esclusivamente antiestrogenica, la riproducibilità e la sensibilità del saggio saranno definite più chiaramente in un secondo tempo, quando il protocollo sperimentale sarà ormai divenuto di routine e dopo che sarà stato identificato un maggior numero di sostanze chimiche aventi tale modo di azione.

11. Tutti i protocolli che prevedono l'uso di animali rispetteranno le norme locali in materia di benessere animale; la descrizione delle cure e del trattamento che figurano in appresso costituiscono norme minime alle quali si sostituiranno le regolamentazioni locali, ad esempio la direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (38). Per ulteriori orientamenti relativi al trattamento degli animali nel rispetto delle norme etiche si veda la pubblicazione dell'OCSE di cui al riferimento bibliografico 25.

12. Come per tutte le prove che utilizzano animali vivi, prima di iniziare il saggio è fondamentale assicurarsi che i dati ricercati siano realmente necessari, come possono esserlo nei due casi seguenti:

— potenziale di esposizione elevato (livello 1 del quadro concettuale, di cui all'appendice 2) oppure elementi indicanti attività estrogenica (livello 2) tali da giustificare la necessità di investigare se tali effetti si possono produrre in vivo;

— effetti indicanti attività estrogenica nei livelli 4 o 5 delle prove in vivo, tali da giustificare la necessità di dimostrare il loro legame con un meccanismo estrogenico non evidenziabile con prove in vitro.

13. Le definizioni dei termini utilizzati nel presente metodo di prova sono contenute nell'appendice 1.

▼M5

PRINCIPIO DELLA PROVA

14. La sensibilità del saggio uterotrofico richiede un sistema sperimentale nel quale l'asse ipotalamo-ipofisario-ovarico dell'animale non sia funzionale, con conseguenti livelli minimi di estrogeni endogeni in circolazione; in tal modo si garantisce un peso uterino di partenza basso e un range massimo di risposta agli estrogeni somministrati. I roditori femmina soddisfano queste condizioni nei seguenti stati di sensibilità agli estrogeni:

i) femmine immature, dopo lo svezzamento e prima della pubertà, e

ii) giovani adulte ovariectomizzate, trascorso il periodo necessario alla regressione dei tessuti uterini.

15. La sostanza chimica è somministrata ogni giorno tramite sonda orogastrica o per iniezione sottocutanea. Si somministrano dosi scalari ad almeno due gruppi di animali (precisazioni al paragrafo 33), esponendo ogni gruppo a un livello di dose. Il periodo di somministrazione è di tre giorni consecutivi nel metodo che utilizza le femmine immature e di almeno tre giorni consecutivi nel metodo con le femmine adulte ovariectomizzate. Gli animali sono sottoposti ad autopsia circa 24 ore dopo l'ultima dose. Per lo studio degli agonisti degli estrogeni, si confronta il peso uterino medio degli animali trattati con quello del gruppo di controllo che ha ricevuto solo il mezzo disperdente, per determinare se esiste un aumento statisticamente significativo. Nel presente saggio, un aumento statisticamente significativo del peso uterino medio di un gruppo sperimentale indica una risposta positiva.

DESCRIZIONE DEL METODO

Selezione delle specie animali

16. Si possono utilizzare i ceppi di roditori di uso comune nei laboratori, ad esempio, i ceppi di ratti Sprague-Dawley e Wistar impiegati nella validazione. Non si dovranno utilizzare ceppi dei quali si sa o si sospetta che l'utero è meno reattivo. Il laboratorio deve dimostrare la sensibilità del ceppo utilizzato come descritto nei paragrafi 26 e 27.

17. L'uso del ratto e del topo come specie di routine per il saggio uterotrofico risale agli anni 30. Gli studi di validazione dell'OCSE sono stati effettuati unicamente sui ratti, partendo dal presupposto che le due specie siano equivalenti e che, per risparmiare risorse e animali, una sola specie sia sufficiente per la validazione a livello internazionale. Il ratto è la specie scelta nella maggior parte degli studi di tossicità per la riproduzione e nella fase dello sviluppo. Dato che esiste una ricca base di dati storici sul topo, per ampliare il campo di applicazione del saggio uterotrofico sui roditori e includere questa specie, è stato condotto un studio complementare di validazione, più circoscritto, sul topo (16). Si è scelto di adottare un approccio comparativo, con un numero limitato di sostanze chimiche esaminate, un numero minore di laboratori coinvolti e senza campioni codificati, in modo da rispettare l'intenzione iniziale di risparmiare risorse e animali. Questo studio comparativo di validazione ha mostrato che esiste una buona corrispondenza qualitativa e quantitativa tra i dati ottenuti nei saggi uterotrofici realizzati con femmine di topo giovani adulte ovariectomizzate e i dati ottenuti nei saggi analoghi con femmine di ratto. Quando i risultati del saggio uterotrofico si inseriscono in una fase preliminare di uno studio a lungo termine, è possibile utilizzare in entrambi gli studi animali dello stesso ceppo e della stessa provenienza. L'approccio comparativo è stato applicato solo per le prove con la femmina di topo ovariectomizzata e la relativa relazione non contiene un insieme di dati abbastanza solido da convalidare il modello che utilizza femmine immature, ragion per cui tale modello non rientra nel campo di applicazione del presente metodo di prova.

▼M5

18. È quindi comprovato che, in alcuni casi, è possibile utilizzare il topo invece del ratto. Questa scelta dovrà essere giustificata da dati tossicologici, farmacocinetici e/o di altra natura e potrà comportare la necessità di modificare il protocollo. Ad esempio, il consumo alimentare del topo rispetto al suo peso corporeo è più elevato di quello del ratto, per cui la quantità di fitoestrogeni contenuta negli alimenti dovrà essere inferiore (9)(20)(22).

Condizioni di stabulazione e alimentazione

19. Tutte le procedure devono essere conformi agli standard locali in materia di cura degli animali sperimentali. Le cure e il trattamento qui descritti costituiscono norme minime alle quali si sostituiranno le regolamentazioni locali, ad esempio la direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (38). La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve mantenersi intorno al 50-60 %; in ogni caso non deve essere inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale, con un fotoperiodo di 12:12 (luce/buio).

20. Gli animali ricevono alimentazione da laboratorio e acqua da bere a volontà. I giovani adulti possono essere alloggiati individualmente o in gruppi fino a tre animali. Data la giovane età, gli animali immaturi sono di preferenza alloggiati in gabbie collettive.

21. È noto che le diete da laboratorio contenenti livelli elevati di fitoestrogeni fanno aumentare il peso uterino nei roditori in misura sufficiente ad interferire con il saggio uterotrofico (13)(14)(15). Livelli elevati di fitoestrogeni e di energia metabolizzabile nelle diete da laboratorio possono anche indurre una pubertà precoce, se sono utilizzati animali immaturi. La presenza di fitoestrogeni dipende innanzitutto dall'inclusione di prodotti a base di soia e erba medica nelle diete da laboratorio e si è constatato che le concentrazioni di fitoestrogeni variano da un lotto di alimenti all'altro (23). Il peso corporeo è una variabile importante, dato che è in stretta relazione con la quantità di alimenti assunti. Pertanto, la dose di fitoestrogeni effettivamente assunta con la stessa dieta può variare secondo la specie e l'età (9). Nei ratti, il consumo alimentare rispetto al peso corporeo della femmina immatura può essere circa doppio di quello della giovane adulta ovariectomizzata, mentre nei topi questo rapporto arriva ad essere quadruplo.

22. I risultati del saggio uterotrofico (9)(17)(18)(19), tuttavia, indicano che, se presenti nella dieta in deboli quantità, i fitoestrogeni non riducono la sensibilità della prova e sono quindi ammessi. A titolo indicativo, le quantità di fitoestrogeni negli alimenti non devono superare 350 µg di equivalente genisteina/grammo di miscela per laboratorio per le femmine immature di ratto Sprague Dawley e Wistar (6)(9). Questa dieta dovrebbe essere adatta anche per le prove sulle giovani adulte ovariectomizzate, le quali, in proporzione al peso corporeo, consumano meno cibo rispetto agli animali immaturi. Se si devono utilizzare femmine di topo adulte ovariectomizzate oppure femmine di ratto più sensibili ai fitoestrogeni, occorrerà ridurre proporzionalmente i livelli di fitoestrogeni nella dieta (20). Un altro fattore da considerare è che l'energia metabolizzabile disponibile varia da una dieta all'altra, e tale differenza può tradursi in uno sfasamento dell'inizio della pubertà (21)(22).

▼M5

23. Prima di cominciare lo studio occorre scegliere attentamente una dieta povera in fitoestrogeni [per maggiori indicazioni, cfr. (6)(9)] o in energia metabolizzabile, per evitare di falsare i risultati (15)(17)(19)(22)(36). Per tenere sotto controllo questi due fattori è importante garantire il buon funzionamento del sistema sperimentale utilizzato dal laboratorio seguendo quanto indicato ai paragrafi 26 e 27. Come misura di precauzione, in conformità alle buone prassi di laboratorio (BPL), si preleva un campione rappresentativo di ciascun lotto di alimenti somministrati durante lo studio per ricercarvi eventualmente la presenza di fitoestrogeni (ad esempio, in caso di peso uterino elevato negli animali di controllo rispetto ai dati storici, oppure in caso di risposta inadeguata all'estrogeno di riferimento, 17-α-etinilestradiolo). Le aliquote sono analizzate nell'ambito dello studio, congelate a – 20 °C, oppure conservate in modo da evitare che il campione si decomponga prima dell'analisi.

24. Alcuni tipi di lettiera possono contenere sostanze estrogeniche o antiestrogeniche naturali (ad esempio, si sa che il tutolo influisce sulla ciclicità nelle femmine di ratto e potrebbe avere effetti antiestrogenici). Il tipo di lettiera scelto dovrà contenere un livello minimo di fitoestrogeni.

Preparazione degli animali

25. Gli animali sperimentali, scelti dopo aver verificato che non presentino segni di malattie né di anomalie fisiche, sono assegnati a caso ai gruppi di trattamento e di controllo. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Gli animali vanno identificati in modo univoco. Di preferenza, durante l'acclimatazione, gli animali immaturi sono messi in gabbia con le loro madri o con altre femmine che allattano fino allo svezzamento. Il periodo di acclimatazione prima dell'inizio dello studio è di circa 5 giorni per le giovani femmine adulte e per gli animali immaturi accompagnati dalle loro madri o da altre femmine. Se gli animali immaturi non sono accompagnati dalla madre e sono già svezzati, il periodo di acclimatazione dovrà essere necessariamente più corto, perché la somministrazione deve iniziare immediatamente dopo lo svezzamento (cfr. paragrafo 29).

PROTOCOLLO

Verifica della competenza del laboratorio

26. La competenza del laboratorio può essere verificata in due modi:

— mediante una verifica periodica, con riferimento a uno studio iniziale di controllo positivo (cfr. paragrafo 27). Almeno ogni 6 mesi e ogni volta che si verifica un cambiamento che può influire sull'esito della prova (ad esempio, una nuova formulazione della dieta, personale diverso che esegue le dissezioni, cambio di ceppo o di fornitore ecc.), occorre verificare la sensibilità del sistema sperimentale (modello animale) a una dose congrua (stabilita in base allo studio iniziale di controllo positivo di cui al paragrafo 27) dell'estrogeno di riferimento, ossia il 17a-etinilestradiolo (n. CAS 57-63-6) (EE);

— mediante il concomitante allestimento di gruppi di controllo, includendo in ciascuna prova un gruppo che riceve una dose congrua dell'estrogeno di riferimento.

Se il sistema non risponde come previsto, occorre rivedere le condizioni sperimentali e modificarle di conseguenza. In entrambi i casi la dose raccomandata dell'estrogeno di riferimento corrisponde circa a DE 70-80 (DE: dose efficace).

▼M5

27. **Studio iniziale di controllo positivo** — Prima di eseguire uno studio applicando per la prima volta il presente metodo di prova, il laboratorio deve dimostrare la propria competenza determinando la risposta del modello animale ad almeno quattro dosi dell'estrogeno di riferimento, il 17a-etinilestradiolo (n. CAS 57-63-6). L'effetto sul peso uterino sarà confrontato con i dati storici consolidati [cfr. riferimento (5)]. Se questo studio iniziale non dà l'esito previsto, le condizioni sperimentali devono essere esaminate e modificate.

Numero e condizione degli animali

28. Ciascun gruppo trattato e di controllo è composto di almeno 6 animali, sia nel protocollo con femmine immature sia in quello con adulte ovariectomizzate.

Età degli animali immaturi

29. Per il saggio uterotrofico con animali immaturi è necessario indicare il giorno di nascita. La somministrazione deve iniziare con sufficiente anticipo per far sì che, alla fine del periodo di somministrazione, non si sia ancora verificato l'aumento fisiologico degli estrogeni endogeni connesso con la pubertà. D'altro canto, è stato constatato che gli animali molto giovani possono essere meno reattivi. Per definire l'età ottimale, ogni laboratorio deve basarsi sui propri dati di riferimento sulla maturazione sessuale.

In linea di massima, la somministrazione delle dosi nei ratti può iniziare subito dopo uno svezzamento precoce, il 18° giorno dopo la nascita (PND 18, tenuto conto che il giorno della nascita corrisponde al giorno 0), e terminare, di preferenza, il PDN 21, e comunque prima del PND 25: a partire da questa età l'asse ipotalamo-ipofisario-ovarico dell'animale diviene funzionale e il livello di estrogeni può cominciare ad innalzarsi, con il concomitante aumento sia del peso uterino medio di riferimento sia della deviazione standard dei gruppi (2)(3)(10)(11)(12).

Ovariectomia

30. L'ovariectomia delle femmine di ratto e topo dei gruppi di trattamento e di controllo è praticata tra la sesta e l'ottava settimana di età. Il tempo che deve trascorrere tra l'operazione e la prima somministrazione affinché l'utero ritorni a un peso minimo di riferimento e si stabilizzi è di almeno 14 giorni nel ratto e almeno 7 giorni nel topo. Poiché basta una piccola quantità di tessuto ovarico per produrre livelli significativi di estrogeni circolanti (3), gli animali devono essere controllati prima della prova, osservando le cellule epiteliali prelevate mediante striscio vaginale per almeno cinque giorni consecutivi (ad esempio, dal 10° al 14° giorno dopo l'ovariectomia nel ratto). Gli animali che presentano segni di pre-estro non devono essere utilizzati. Inoltre, al momento dell'autopsia, occorre esaminare i peduncoli ovarici per determinare se resta del tessuto ovarico, nel qual caso, i dati relativi all'animale non devono essere presi in considerazione nei calcoli (3).

31. L'ovariectomia è praticata sull'animale disteso sul ventre, opportunamente anestetizzato. Si incide la zona dorso-laterale della parete addominale con un taglio di circa 1 cm nel punto intermedio tra il bordo costale inferiore e la cresta iliaca, a qualche millimetro dal margine laterale del muscolo lombare. Si asportano le ovaie dalla cavità addominale, le si deposita su campo sterile e si recidono a livello della giunzione dell'ovidotto e del corpo dell'utero. Dopo aver escluso la presenza di emorragia importante, si sutura la parete addominale e si richiude la pelle con clip o sutura idonea. I punti di legatura sono indicati schematicamente nella figura 1. Sarà poi praticata un'analgesia postoperatoria adeguata, raccomandata da un veterinario specializzato in roditori.

▼M5

Peso corporeo

32. Nel metodo che utilizza femmine adulte ovariectomizzate, il peso corporeo e il peso dell'utero non sono correlati, perché quest'ultimo è influenzato da ormoni come gli estrogeni, ma non dai fattori di crescita che regolano la corporatura. Il peso corporeo è invece connesso al peso uterino negli animali immaturi, durante il periodo di maturazione (34). Pertanto, all'inizio dello studio con animali immaturi, la variazione di peso tra gli animali deve essere minima e non superare ± 20 % del peso medio. Ciò significa che le dimensioni della nidiata devono essere standardizzate dall'allevatore, per garantire che la progenie di madri diverse sia nutrita più o meno allo stesso modo. Gli animali sono assegnati ai gruppi (di controllo e di trattamento) in maniera aleatoria, in modo che non vi sia alcuna differenza statistica tra il peso corporeo medio dei vari gruppi. Conviene evitare nella misura del possibile di destinare animali della stessa nidiata allo stesso gruppo di trattamento, senza però che ciò comporti un aumento del numero di nidiate necessarie allo studio.

Dosaggio

33. Per stabilire se una sostanza chimica può avere un'azione estrogenica in vivo, in genere è sufficiente allestire due gruppi-dose e un gruppo di controllo: è questo il disegno sperimentale da preferirsi per motivi dettati dal benessere degli animali. Se lo scopo è ottenere una curva della relazione dose-risposta o estrapolare i risultati per applicarli a dosi più basse, sono necessari almeno 3 gruppi-dose. Se si desidera ottenere informazioni più particolareggiate sull'attività estrogenica (ad esempio, una stima dell'efficacia) occorre prevedere un altro schema di dosaggio. Fatta eccezione per la somministrazione della sostanza in esame, gli animali del gruppo di controllo devono essere trattati in modo identico a quelli dei gruppi che ricevono il trattamento. Se per somministrare la sostanza in esame si utilizza un mezzo disperdente, il gruppo di controllo riceverà la stessa quantità di mezzo disperdente usato per i gruppi trattati (o la quantità massima utilizzata se questa varia da gruppo a gruppo).

34. L'obiettivo, nel caso del saggio uterotrofico, è di scegliere delle dosi che garantiscano la sopravvivenza degli animali e non inducano tossicità né distress significativi dopo tre giorni consecutivi di somministrazione della sostanza chimica, fino a una dose massima quotidiana di 1 000 mg/kg. Tutti i livelli di dose devono essere proposti e scelti tenendo conto degli eventuali dati esistenti sulla tossicità e sulla (tossico)cinetica della sostanza in esame o di sostanze affini. Il livello di dose più elevato deve essere stabilito innanzitutto in base alla DL50 e/o alle informazioni sulla tossicità acuta, onde evitare il decesso, sofferenze gravi o distress degli animali (24)(25)(26). La dose più elevata deve costituire la dose massima tollerata (MTD); è anche possibile basarsi su uno studio effettuato utilizzando un livello di dose che abbia indotto una risposta uterotrofica positiva. Per uno screening, è possibile in genere distanziare di molto i livelli di dose (ad esempio, a intervalli di mezza unità logaritmica, ossia a un fattore di progressione di 3,2 o persino 1 unità logaritmica). In mancanza di dati al riguardo, si può svolgere uno studio volto ad identificare il range di dosi utilizzabili.

35. In alternativa, se l'efficacia estrogenica di un agonista può essere stimata mediante dati in vitro (o in silico), questi possono essere presi in considerazione per la scelta delle dosi. Ad esempio, la quantità di sostanza chimica in esame che produrrà risposte uterotrofiche equivalenti a quelle dell'agonista di riferimento (etinilestradiolo) è stimata tramite la corrispettiva efficacia in vitro rispetto a quella dell'etinilestradiolo. La dose sperimentale massima si ottiene moltiplicando questa dose equivalente per un fattore adeguato, ad esempio 10 o 100.

▼M5

Determinazione del range di dosi

36. Se necessario, è possibile effettuare uno studio preliminare con pochi animali per individuare il range di dosi. A tale riguardo, può essere utile consultare il documento di orientamento dell'OCSE n. 19 (25), che definisce i segni clinici di tossicità o distress negli animali. Se tale studio preliminare lo consente, dopo tre giorni di trattamento gli uteri possono essere escissi e pesati a circa 24 ore dall'ultima dose. I dati ricavati possono poi essere utilizzati per mettere a punto lo studio principale (individuare la dose massima e minima accettabili e raccomandare il numero di gruppi-dose).

Somministrazione delle dosi

37. La sostanza chimica è somministrata tramite sonda orogastrica o per iniezione sottocutanea. Quando si sceglie la via di somministrazione occorre tener conto sia del benessere degli animali sia di vari aspetti tossicologici, quali l'attinenza con la via di esposizione umana alla sostanza chimica (sonda orogastrica per un'esposizione tramite ingestione, iniezione sottocutanea per un'esposizione mediante inalazione o assorbimento cutaneo), le caratteristiche fisico-chimiche della sostanza in esame e soprattutto le informazioni tossicologiche e i dati metabolici e cinetici (ad esempio, la necessità di evitare il metabolismo di primo passaggio, una migliore efficacia di una determinata via di somministrazione).

38. Si raccomanda di considerare in primo luogo, ogniqualvolta possibile, l'uso di una soluzione/sospensione acquosa. Dato però che i ligandi degli estrogeni o i loro precursori metabolici tendono ad essere idrofobi, è più comune utilizzare una soluzione/sospensione oleosa (ad esempio, olio di mais, di arachidi, di sesamo o d'oliva). Tuttavia, poiché questi oli non hanno lo stesso valore calorico, né lo stesso tenore in grassi, il mezzo disperdente può influire sull'apporto complessivo di energia metabolizzabile, alterando di conseguenza gli endpoint misurati, quali il peso uterino, soprattutto nel metodo che impiega gli animali immaturi (33). Pertanto, prima di iniziare lo studio, il mezzo disperdente prescelto deve essere testato con riferimento ai controlli senza mezzo disperdente. Le sostanze in esame possono essere disciolte in una quantità minima di etanolo 95 % o di altri solventi idonei, poi diluite nel mezzo disperdente prescelto alle concentrazioni finali desiderate. Le caratteristiche tossiche del solvente devono essere note e testate su un gruppo di controllo a parte trattato unicamente con il solvente. Se la sostanza in esame è considerata stabile, se ne può favorire la solubilizzazione riscaldandola leggermente e sottoponendola ad una azione meccanica vigorosa. È necessario determinare la stabilità della sostanza chimica in esame nel mezzo disperdente. Se la sostanza in esame rimane stabile per tutta la durata dello studio, se ne prepara inizialmente un'aliquota, dopodiché giorno per giorno si preparano le diluizioni necessarie.

39. Il calendario per la somministrazione dipende dal modello animale utilizzato (cfr. paragrafo 29 per le femmine immature e il paragrafo 30 per le femmine ovariectomizzate). Nel caso delle femmine di ratto immature, la sostanza in esame è somministrata quotidianamente per tre giorni consecutivi. Un trattamento della durata di tre giorni è raccomandato anche per le femmine di ratto ovariectomizzate, le quali possono però essere esposte anche per periodi più lunghi, favorendo in tal modo la ricerca di sostanze ad azione più debole. Per le femmine di topo ovariectomizzate, tre giorni di trattamento sono di norma sufficienti per individuare gli agonisti estrogenici potenti, senza che vi siano vantaggi significativi a prolungare questo periodo fino a sette giorni, mentre per gli estrogeni deboli lo studio di validazione non ha comprovato tale relazione (16), pertanto la durata della somministrazione deve essere protratta fino a sette giorni consecutivi.La dose va somministrata ogni giorno all'incirca alla stessa ora e regolata in modo da mantenere un livello costante rispetto al peso corporeo degli animali (ad esempio, mg di sostanza in esame per kg di peso corporeo al giorno). Si deve ridurre al minimo la variabilità del volume in esame rispetto al peso corporeo, adeguando le concentrazioni in modo che, in proporzione al peso corporeo, il volume somministrato sia lo stesso per tutti i livelli di dose e per tutte le vie di somministrazione.

▼M5

40. La somministrazione forzata deve effettuarsi in dose unica giornaliera, mediante sonda gastrica o cannula per intubazione. Il volume massimo di liquido che può essere somministrato in una sola volta dipende dalla taglia dell'animale e dalle linee guida locali sulla cura degli animali, ma in ogni caso non deve essere superiore a 5 ml/kg di peso corporeo, salvo nel caso di soluzioni acquose, delle quali se ne possono somministrare 10 ml/kg di peso corporeo.

41. Se la sostanza in esame è iniettata per via sottocutanea, la somministrazione si effettua in dose unica giornaliera. Le iniezioni sono effettuate nella regione dorsoscapolare o lombare con ago sterile (di calibro 23 o 25) e una siringa da insulina. La rasatura del sito di iniezione è facoltativa. Le eventuali perdite e fuoriuscite di liquido al momento dell'iniezione o una somministrazione incompleta devono essere indicate nella relazione. Il volume complessivo per ratto per giorno non supera 5 ml/kg di peso corporeo, suddiviso in due siti di iniezione, tranne nel caso delle soluzioni acquose, delle quali si possono utilizzare 10 ml/kg di peso corporeo.

Osservazioni

Osservazioni generali e cliniche

42. Almeno una volta al giorno si esegue un'osservazione clinica generale, con più frequenza se si constatano segni di tossicità. Le osservazioni sono effettuate di preferenza ogni giorno alla stessa ora e tenendo conto del momento in cui si prevede che gli effetti siano più accentuati dopo la somministrazione delle dosi. Tutti gli animali sono osservati per controllare la mortalità, la morbilità e i segni clinici generali quali alterazioni del comportamento, della cute, del pelo, degli occhi, delle mucose, comparsa di secrezioni ed escrezioni e l'attività autonomica (ad esempio lacrimazione, piloerezione, ampiezza pupillare, alterazioni della respirazione).

Peso corporeo e consumo alimentare

43. Tutti gli animali sono pesati quotidianamente (peso espresso in grammi, arrotondato al primo decimale), a partire da appena prima di avviare il trattamento, ossia al momento dell'assegnazione degli animali ai gruppi. Si può scegliere di misurare anche la quantità di cibo consumata durante il periodo del trattamento in ogni gabbia, pesando i contenitori di cibo. I dati sul consumo alimentare sono espressi in grammi per ratto al giorno.

Dissezione e pesatura dell'utero

44. Ventiquattro ore dopo l'ultimo trattamento, i ratti sono soppressi con metodi non cruenti. Idealmente, l'ordine nel quale i gruppi di animali sono sottoposti ad autopsia è aleatorio e non segue l'ordine crescente o decrescente delle dosi, perché ciò potrebbe influire leggermente sui dati. L'obiettivo del saggio è di misurare il peso umido e il peso secco degli uteri. Il peso umido è quello dell'utero e del fluido del lume. Il peso secco è quello misurato dopo la spremitura dell'utero e l'eliminazione del fluido.

45. Prima della dissezione si esamina la vagina delle femmine immature per osservarne lo stato di apertura. La dissezione inizia con l'apertura della parete addominale a livello della sinfisi pubica. Le corna uterine e le ovaie, se presenti, sono staccate dalla parete addominale dorsale. La vescica e gli ureteri sono separati dal lato ventrale e laterale dell'utero e della vagina. Il tessuto fibroso del setto retto-vaginale è scollato fino a individuare la giunzione dell'orifizio vaginale e della cute perineale. L'utero e la vagina sono staccati dal corpo incidendo la parete vaginale appena sopra la giunzione della cute perineale, come illustrato nella figura 2. L'utero è staccato dal corpo recidendo delicatamente il mesentere nel punto di attacco lungo tutta

▼M5

la componente dorso-laterale di ciascun corno uterino. Una volta estratto, l'utero deve essere manipolato con rapidità tale da evitare la disidratazione dei tessuti. La perdita di peso dovuta a disidratazione è più importante con tessuti di piccole dimensioni, come l'utero (23). Se presenti, le ovaie sono staccate a livello dell'ovidutto, procedendo in modo da evitare la perdita di fluido del lume dal corno uterino. Se l'animale è stato ovariectomizzato, i peduncoli sono esaminati per rilevare l'eventuale presenza di tessuto ovarico. Si eliminano il grasso in eccesso e il tessuto connettivo. La vagina è staccata dall'utero appena sotto la cervice, in modo che quest'ultima resti insieme al corpo dell'utero, come illustrato nella figura 2.

46. Ogni utero è trasferito in un recipiente tarato e recante un contrassegno univoco (ad esempio, una capsula Petri o una navicella per pesata in plastica), continuando a fare attenzione a che non si disidrati prima della pesata (si può collocare nel recipiente un pezzo di carta da filtro leggermente inumidito con soluzione salina). Si pesa l'utero e il fluido del lume (peso uterino umido, espresso in mg e arrotondato al primo decimale).

47. Ogni utero è poi trattato singolarmente per eliminare il fluido del lume. Si perforano le due corna uterine oppure le si taglia lungo l'asse longitudinale. Si deposita l'utero su un pezzo di carta da filtro leggermente inumidita (ad esempio, Whatman n. 3) e lo si comprime delicatamente con un secondo pezzo di carta da filtro, anch'esso leggermente inumidito, fino ad eliminare completamente il fluido del lume. Si pesa l'utero svuotato del suo contenuto del lume (peso uterino secco, espresso in mg arrotondato al primo decimale).

48. Il peso uterino a fine prova può servire per verificare che le femmine di ratto immature intatte non abbiano superato l'età appropriata, sebbene i dati storici del ceppo utilizzato dal laboratorio siano determinanti a questo riguardo (per l'interpretazione dei risultati, cfr. paragrafo 56).

Studi facoltativi

49. L'utero, dopo essere stato pesato, può essere messo in formalina tamponata al 10 % a ph neutro per essere sottoposto a esame istopatologico, previa colorazione con ematossilina ed eosina. Anche la vagina può essere esaminata (cfr. paragrafo 9). Si possono inoltre eseguire misurazioni morfometriche dell'epitelio endometriale a fini di raffronti quantitativi.

DATI E RELAZIONE

Dati

50. I dati devono comprendere:

— numero degli animali all'inizio della prova,

— numero e identità degli animali trovati morti durante la prova o soppressi a fini etici, nonché data e ora di ogni decesso naturale o indotto,

— numero e identità degli animali che presentano segni di tossicità e descrizione dei segni di tossicità osservati, con indicazione di data e ora della loro comparsa, durata e gravità degli effetti tossici, e

— numero e identità degli animali che presentano lesioni e descrizione del tipo di lesione.

▼M5

51. Il peso corporeo, il peso uterino umido e il peso uterino secco sono informazioni da indicare nella relazione per ciascun animale. Per determinare se la somministrazione della sostanza in esame provoca un aumento statisticamente significativo ($p < 0,05$) del peso uterino si ricorre ad analisi statistiche unilaterali per gli agonisti. Occorre effettuare analisi statistiche atte a determinare se il peso uterino secco e umido ha subito alterazioni dovute alla sostanza somministrata. Ad esempio, i dati possono essere valutati mediante un'analisi di covarianza (ANCOVA) in cui la covariabile è il peso corporeo al momento dell'autopsia. L'analisi dei dati uterini può essere preceduta da una trasformazione logaritmica che stabilizza la varianza. I test di Dunnet e Hsu si prestano per confrontare in parallelo ogni gruppo-dose e i controlli con mezzo disperdente e calcolare gli intervalli di confidenza. Per individuare eventuali valori anomali (*outlier*) e verificare l'omogeneità delle varianze si può applicare un'analisi del residuo studentizzato. Queste procedure sono state applicate nel programma di validazione dell'OCSE con l'ausilio della PROC GLM del sistema di analisi statistica (SAS Institute, Cary, NC), versione 8 (6)(7).

52. La relazione finale deve contenere le seguenti informazioni.

Centro di saggio:

— personale responsabile dello studio e rispettive responsabilità,

— dati dello studio iniziale di controllo positivo e dati periodici di controllo positivo (cfr. paragrafi 26 e 27).

Sostanza chimica in esame:

— caratterizzazione della sostanza chimica in esame,

— natura fisica e, se del caso, proprietà fisicochimiche,

— metodo e frequenza della preparazione delle diluizioni,

— qualsiasi dato ottenuto sulla stabilità,

— qualsiasi analisi delle soluzioni somministrate.

Mezzo disperdente:

— caratterizzazione del mezzo disperdente utilizzato nella prova (natura, fornitore e lotto),

— giustificazione della scelta del mezzo disperdente (se diverso dall'acqua).

Animali sperimentali:

— specie e ceppo utilizzati e giustificazione della scelta,

— fornitore e stabilimento specifico del fornitore,

— età all'epoca della consegna e data di nascita,

— per gli animali immaturi, indicare se forniti con la madre o altra femmina che allatta e data dello svezzamento,

— dettagli della procedura di acclimatazione degli animali,

— numero di animali per gabbia,

— dettagli e metodo di identificazione dei singoli esemplari e dei gruppi.

Condizioni sperimentali:

— dettagli del processo di randomizzazione (ad esempio, metodo utilizzato),

— motivazione della scelta delle dosi,

▼M5

— dettagli della formulazione della sostanza chimica in esame, delle concentrazioni ottenute, della stabilità e dell'omogeneità,

— dettagli della somministrazione della sostanza chimica in esame e motivazione della scelta della via di esposizione,

— dieta (nome, tipo, fornitore, composizione e, se noti, livelli di fitoestrogeni),

— tipo di acqua (ad esempio, di rubinetto o filtrata) e modo di somministrazione (abbeveratoi alimentati da un grande recipiente, biberon ecc.),

— lettiera (nome, tipo, fornitore, composizione),

— dati sulle condizioni di stabulazione, fotoperiodo, temperatura, umidità e pulizia del locale,

— descrizione dettagliata dell'autopsia e della pesatura degli uteri,

— descrizione dei metodi statistici.

Risultati

Per ciascun animale:

— registrazione giornaliera del peso corporeo (in grammi, arrotondato al primo decimale), a partire dal momento dell'assegnazione al gruppo fino all'autopsia,

— età dell'animale (espressa in giorni, tenuto conto che il giorno 0 è quello della nascita) all'inizio della somministrazione della sostanza in esame,

— data e ora di ciascuna somministrazione,

— volume calcolato e dosaggio somministrato e osservazioni sulle eventuali perdite di prodotto durante o dopo la somministrazione,

— registrazione giornaliera dello stato dell'animale, con particolare indicazione dei sintomi e delle osservazioni,

— causa sospetta del decesso (se l'animale è trovato morto o moribondo durante lo studio),

— data e ora dell'eutanasia e tempo trascorso dalla somministrazione dell'ultima dose,

— peso uterino umido (in mg, arrotondato al primo decimale) e eventuali osservazioni sulle perdite di fluido del lume durante la dissezione e la preparazione per la pesata,

— peso uterino secco (in mg, arrotondato al primo decimale).

Per ciascun gruppo di animali:

— registrazione giornaliera del peso corporeo medio (in grammi, arrotondato al primo decimale) e deviazioni standard (a partire dal momento dell'assegnazione al gruppo fino all'autopsia),

— peso uterino medio fresco e secco (in mg, arrotondato al primo decimale) e deviazioni standard,

— se misurato, consumo alimentare giornaliero (calcolato in grammi di cibo consumato per animale),

▼M5

— risultati delle analisi statistiche comparative del peso uterino fresco e secco dei gruppi trattati e di quello dei gruppi di controllo cui è stato somministrato il mezzo disperdente,

— risultati delle analisi statistiche comparative del peso corporeo complessivo e dell'aumento di peso corporeo dei gruppi trattati con quello dei gruppi di controllo cui è stato somministrato il mezzo disperdente.

53. Tabella riassuntiva degli elementi salienti del metodo di prova

	Ratto	**Topo**
Animali		
Ceppo	Ceppo di roditori comunemente usato in laboratorio	
Numero di animali	Un minimo di 6 animali per gruppo	
Numero di gruppi	Un minimo di 2 gruppi sperimentali (cfr. paragrafo 33) e un gruppo di controllo negativo Per orientamenti sui gruppi di controllo positivi, cfr. paragrafi 26 e 27	
Condizioni di stabulazione e alimentazione		
T° locale di stabulazione	22 °C ± 3 °C	
Umidità relativa	50-60 % non inferiore a 30 % né superiore a 70 %	
Fotoperiodo	12:12 (luce/buio)	
Dieta e acqua da bere	Ad libitum	
Stabulazione	Individuale o in gruppi di tre animali al massimo (gabbie collettive raccomandate per gli animali immaturi)	
Dieta e lettiera	Bassi livelli di fitoestrogeni raccomandati nella dieta e nella lettiera	
Protocollo		
Metodo	Metodo con femmine immature non ovariectomizzate (da privilegiare) Metodo con femmine adulte ovariectomizzate	Metodo con femmine adulte ovariectomizzate
Età di trattamento degli animali immaturi	Non prima del 18° giorno postnatale Fine trattamento prima del 25° giorno postnatale	Non pertinente per questo metodo
Età all'ovariectomia	Fra 6 e 8 settimane	
Età di trattamento degli animali ovariectomizzati	Almeno 14 giorni devono intercorrere tra l'ovariectomia e il 1° giorno di somministrazione	Almeno 7 giorni devono intercorrere tra l'ovariectomia e il 1° giorno di somministrazione
Peso corporeo	La variazione del peso corporeo deve essere minima e non superiore a ± 20 % del peso medio	

▼M5

	Ratto	Topo
Dosaggio		
Via di somministrazione	Sonda orogastrica o iniezione sottocutanea	
Frequenza di somministrazione	Dose unica giornaliera	
Volume somministrato per sonda e iniezione	≤ 5 ml/kg peso corporeo (o fino a 10 ml/kg peso corporeo in caso di soluzioni acquose) (in 2 siti di iniezione sottocutanea)	
Durata della somministrazione	3 giorni consecutivi per le femmine immature Almeno 3 giorni consecutivi per le femmine ovariectomizzate	7 giorni consecutivi per le femmine ovariectomizzate
Data dell'autopsia	Circa 24 ore dopo l'ultima dose	
Risultati		
Risposta positiva	Aumento statisticamente significativo del peso uterino medio (umido e/o secco)	
Estrogeno di riferimento	17-α-etinilestradiolo	

ORIENTAMENTI PER L'INTERPRETAZIONE E L'ACCETTAZIONE DEI RISULTATI

54. In genere, una prova per la ricerca di estrogeni è da considerarsi positiva se si constata un aumento statisticamente significativo del peso uterino ($p < 0,05$), almeno nel gruppo trattato con la dose più elevata rispetto al gruppo di controllo con solvente. Il risultato positivo è corroborato dalla dimostrazione di una relazione biologicamente plausibile tra la dose e l'entità della risposta, tenendo presente che la sovrapposizione degli effetti estrogenici e antiestrogenici della sostanza in esame può influire sull'andamento della curva dose-risposta.

55. Per poter interpretare correttamente i dati occorre fare attenzione a non superare la dose massima tollerata, valutando scrupolosamente a tal fine la riduzione del peso corporeo, i segni clinici e altri reperti.

56. Un elemento importante da considerare per l'accettazione dei dati del saggio uterotrofico è il peso uterino del gruppo di controllo trattato con il mezzo disperdente. Se i valori del gruppo di controllo sono elevati possono compromettere la reattività del saggio e la capacità di individuare agonisti degli estrogeni ad azione molto debole. I dati ricavati dalla letteratura e quelli ottenuti durante la convalida del saggio uterotrofico paiono indicare che le medie dei controlli possono essere spontaneamente alte, in particolare negli animali immaturi (2)(3)(6)(9). Poiché il peso uterino delle femmine di ratto immature dipende da molte variabili, come il ceppo o il peso corporeo, non è possibile stabilire un limite massimo preciso per il peso uterino. A titolo indicativo, se il peso uterino secco nei controlli immaturi è compreso tra 40 e 45 mg, i risultati possono essere ritenuti sospetti, e se supera i 45 mg può essere necessario ripetere la prova, valutando comunque caso per caso (3)(6)(8). Nelle prove con femmine di ratto adulte occorre tener presente che se l'ovariectomia è stata incompleta i resti di tessuto ovarico possono produrre estrogeni endogeni e ritardare la regressione del peso uterino.

▼M5

57. Per i gruppi di controllo cui è stato somministrato il mezzo disperdente, un peso uterino secco inferiore a 0,09 % del peso corporeo per gli animali immaturi e a 0,04 % per gli animali giovani ovariectomizzati pare dare risultati accettabili [cfr. tabella 31 (2)]. Se il peso uterino dei controlli è superiore a questi valori, occorre verificare vari fattori, in particolare l'età degli animali, l'esito dell'ovariectomia, i fitoestrogeni presenti nella dieta ecc., e un eventuale risultato negativo (nessun indizio di attività estrogenica) deve essere considerato con prudenza.

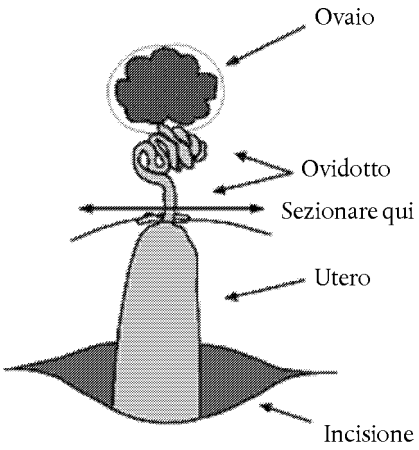
58. Il laboratorio deve conservare i dati storici riguardanti i gruppi di controllo trattati con il mezzo disperdente, così come i dati storici sugli effetti degli estrogeni di riferimento positivi, come il 17a-etinilestradiolo. Il laboratorio può anche testare gli effetti di agonisti degli estrogeni di cui è nota la debole attività. Per garantire che i metodi impiegati dal laboratorio siano sufficientemente sensibili, tutti questi dati possono essere confrontati con i dati disponibili (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8).

59. Nello studio di validazione dell'OCSE, la variabilità ponderale si è rivelata minore negli uteri asciutti che in quelli umidi (6) (7). Tuttavia, una risposta significativa nell'uno o nell'altro caso sta a indicare che la sostanza in esame è positiva (vale a dire, esplica attività estrogenica).

60. Sebbene la risposta uterotrofica non sia unicamente d'origine estrogenica, un risultato positivo del saggio uterotrofico deve essere in linea di principio interpretato come prova di attività estrogenica in vivo, e deve normalmente dar luogo a ricerche più approfondite (cfr. paragrafo 9 e appendice 2, in cui figura il «Quadro concettuale dell'OCSE per la sperimentazione e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino»).

Figura 1

Schema dell'ablazione chirurgica delle ovaie



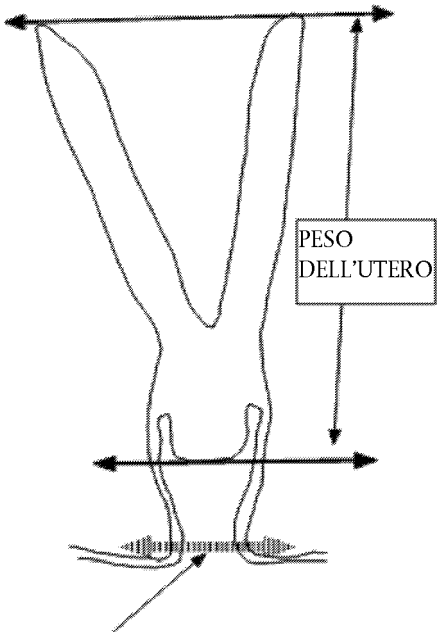
Mesometrio, vascolarizzazione e massa adiposa non compaiono nella figura

Si inizia incidendo la zona dorso-laterale della parete addominale nel punto intermedio tra il bordo costale inferiore e la cresta iliaca, a qualche millimetro dal margine laterale del muscolo lombare. Si individuano le ovaie all'interno della cavità addominale. Si rimuovono le ovaie dalla cavità addominale e le si colloca su campo sterile, si lega il dotto tra l'ovaia e l'utero per fermare l'emorragia e si separa l'ovaia con un'incisione al di sopra della legatura, in corrispondenza della giunzione dell'ovidutto e di ciascun corno uterino. Dopo aver escluso il persistere di un'emorragia importante, si sutura la parete addominale e si richiude la pelle mediante clip o sutura. Prima di utilizzare gli animali, li si lascia ristabilire per almeno 14 giorni affinché il peso dell'utero diminuisca.

▼**M5**

Figura 2

Prelievo e preparazione dei tessuti uterini per la pesatura



S'inizia con l'aprire la parete addominale a livello della sinfisi pubica. Si staccano poi entrambe le ovaie, se presenti, e le corna uterine dalla parete addominale dorsale. Si staccano anche la vescica e gli ureteri dal lato ventrale e laterale dell'utero e della vagina. Si scolla il tessuto fibroso del setto retto-vaginale fino a quando si individua la giunzione dell'orifizio vaginale e della cute perineale. Si staccano utero e vagina dal corpo incidendo la parete vaginale appena sopra la giunzione della cute perineale, come illustrato nella figura. L'utero è staccato dal corpo recidendo delicatamente il mesentere nel punto di attacco su tutta la lunghezza della componente dorso-laterale di ciascun corno uterino. Dopo l'asportazione dal corpo, si eliminano il grasso in eccesso e il tessuto connettivo. Se presenti, si staccano le ovaie a livello dell'ovidutto procedendo in modo da evitare la perdita di fluido del lume dal corno uterino. Se l'animale è stato ovariectomizzato, si esaminano i peduncoli per rilevare l'eventuale presenza di tessuto ovarico. Si separa la vagina dall'utero appena sotto la cervice, in modo che quest'ultima resti insieme al corpo dell'utero, come illustrato nella figura. L'utero può a questo punto essere pesato.

▼**M5**

Appendice 1

DEFINIZIONI

Antiestrogenicità: capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività del 17ß-estradiolo nei mammiferi.

Data di nascita: giorno 0 dopo la nascita.

Dosaggio: termine generale che indica la dose, la frequenza e la durata della somministrazione.

Dose massima tollerata (MTD): quantità massima di una sostanza chimica che, al momento dell'introduzione nell'organismo, non è fatale per gli animali sperimentali (indicata con LD_0) (IUPAC, 1993).

Dose: quantità di sostanza chimica somministrata. Nel saggio uterotrofico, la dose è espressa come peso della sostanza in esame per unità di peso corporeo dell'animale sperimentale per giorno (ad esempio, mg/kg peso corporeo/giorno).

Estrogenicità: capacità di una sostanza chimica di agire come il 17ß-estradiolo nei mammiferi.

Giorno postnatale X: giorno X di vita dopo il giorno di nascita.

Sensibilità: proporzione di tutte le sostanze chimiche positive/attive correttamente classificate dalla prova. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per verificare la pertinenza di un metodo.

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

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

Specificità: proporzione di tutte le sostanze chimiche negative/inattive correttamente classificate dal test. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per verificare la pertinenza di un metodo.

Uterotrofico: termine utilizzato per descrivere un influsso positivo sulla crescita dei tessuti dell'utero.

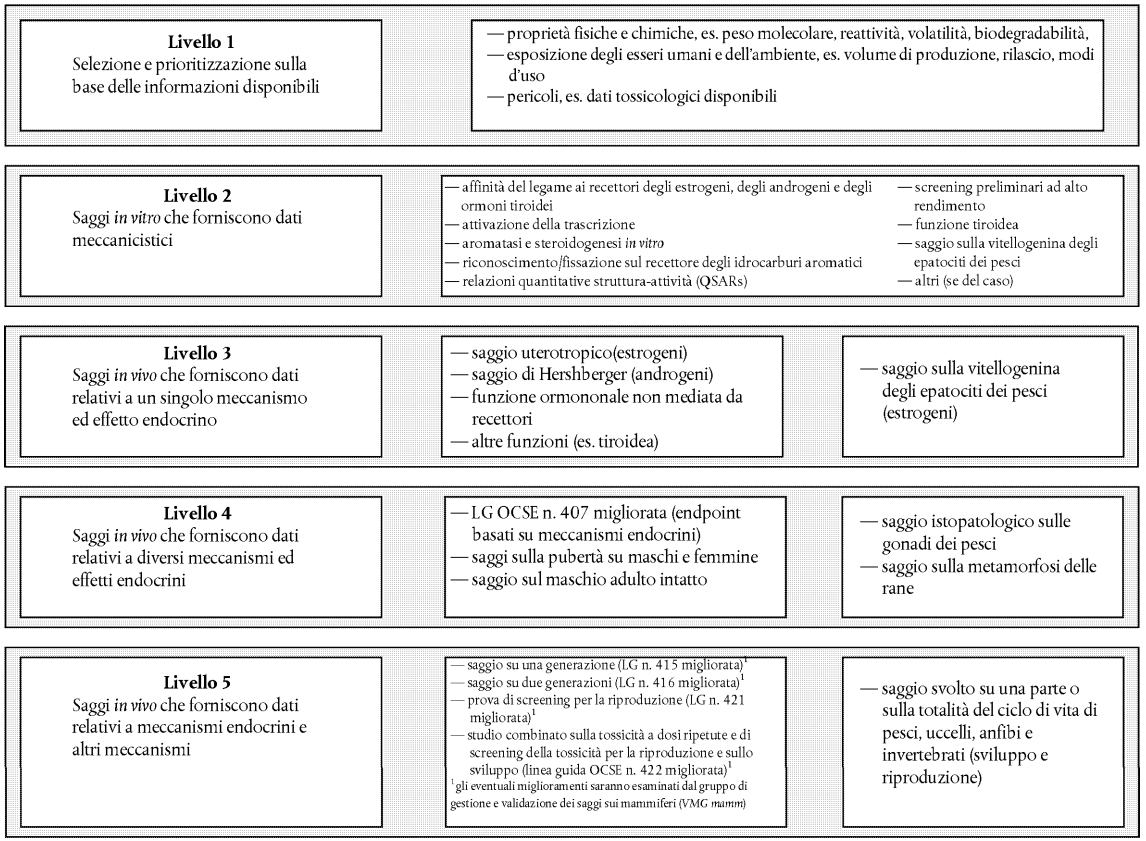
Validazione: processo scientifico destinato a caratterizzare i requisiti e i limiti operativi di un metodo di prova e a dimostrarne l'affidabilità e la pertinenza per un determinato obiettivo.

▼M5

Appendice 2

Nota: documento preparato dal Segretariato del Programma sulle linee guida, a partire dall'accordo raggiunto alla VI riunione del gruppo di studio sulla sperimentazione e sulla valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino (*EDTA Task Force*)

Quadro concettuale dell'OCSE per la sperimentazione e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino



VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment (gruppo di gestione della validazione nell'ambito della sperimentazione e della valutazione dei mammiferi)

02008R0440 — IT — 08.01.2026 — 011.001 — 501

▼**M5**

NOTE RELATIVE AL QUADRO CONCETTUALE

Nota 1: è possibile aderire al quadro e discostarsene a partire da qualsiasi livello, in base alla natura delle informazioni necessarie ai fini della valutazione dei rischi e dei pericoli.

Nota 2: nel livello 5, l'analisi ecotossicologica deve includere endpoint che evidenzino i meccanismi degli effetti indesiderati nonché dei potenziali danni per la popolazione.

Nota 3: se un modello multimodale comprende diversi metodi di prova che forniscono dati su un unico endpoint, tale modello deve sostituire i singoli metodi.

Nota 4: ogni sostanza chimica deve essere valutata caso per caso, alla luce di tutte le informazioni disponibili e tenendo presente la funzione dei livelli del quadro.

Nota 5: la versione attuale del quadro è da considerarsi esaustiva. Tra le prove che figurano nei livelli 3, 4 e 5, alcune sono già disponibili, altre devono ancora essere convalidate e vi sono incluse provvisoriamente. Saranno confermate una volta messe a punto e convalidate.

Nota 6: il livello 5 non è inteso a contenere solo metodi di prova definitivi. I metodi che vi figurano servono ai fini della valutazione generale dei rischi e dei pericoli.

▼M5

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10^{th}-11^{th} March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.

(3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445-520.

(4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay — Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.

(5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785-94.

(6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 — Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.

(7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dose Response Studies. Environ. Health Persp.111:1530-1549

(8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp.111:1550-1558.

(9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559-1567.

(10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [I^{125}]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582-587.

(11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17b-estradiol. Endocrinology 117:2229-2237.

(12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10-15.

(13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science 118:650-651.

(14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. Fd. Cosmet. Toxicol. 13:425-427.

(15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. Environ. Health Perspec.106:369-373.

▼M5

(16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.

(17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. Toxicol. Lett. 128:145-157.

(18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. Food Chem. Toxicol. 41:1517-1525.

(19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. Arch. Toxicol. 76:613-620.

(20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. Comp. Med. 53:477-485.

(21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. J. Appl. Toxicol.20:343-347.

(22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. Cancer Detect. Prev. 26:381-393.

(23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. Lab. Anim. Sci.37:596-601.

(24) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

(25) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. J. Physiol. 85: 320 — 333.

(28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. Endocrinology 19: 33 — 41.

(29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. Fundam. Appl. Toxicol. 34: 288 — 305.

(30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. Fertil. Steril. 24: 284 — 291.

(31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

(32) Dorfman R.I. (1962). Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.

(33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. ILAR J 45(4): 401-416.

▼**M5**

(34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. Toxicol Ind Health. 14 (1-2): 159-184.

(35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. Science 131:1807-1808.

(36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. J. Agric Food Chem. 52, 1410-1414.

(37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.

(38) 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).

▼M5

B.55. **SAGGIO DI HERSHBERGER SUL RATTO: SAGGIO DI SCREENING A BREVE TERMINE DELLE PROPRIETÀ (ANTI)ANDROGENICHE**

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 441 (2009). Nel 1998 l'OCSE ha avviato lavori a carattere altamente prioritario per rivedere le linee guida esistenti ed elaborarne di nuove per lo screening e le prove delle sostanze considerate interferenti endocrini potenziali (1). Tra gli elementi su cui si sono concentrati questi lavori figura la messa a punto di una linea guida per il saggio di Hershberger sul ratto. Dopo svariati decenni di utilizzo da parte dell'industria farmaceutica, questo saggio è stato standardizzato per la prima volta nel 1962 da un comitato ufficiale di esperti come strumento di screening delle sostanze chimiche androgeniche (2). Tra il 2001 e il 2007 il saggio è stato sottoposto ad un vasto programma di validazione, che ha incluso la stesura di un documento di revisione (23), un articolo dettagliato sui metodi (3), una guida per la dissezione (21) e intensi studi intra e interlaboratorio, volti a dimostrare l'affidabilità e la riproducibilità del saggio. Tali studi di validazione sono stati condotti con un potente androgeno di riferimento (testosterone propionato, TP), due potenti androgeni sintetici (acetato di trenbolone e metiltestosterone), un potente farmaco antiandrogenico (flutamide), un potente inibitore (finasteride) della sintesi dell'androgeno naturale diidrossitestosterone (DHT), vari pesticidi a debole azione antiandrogenica (linuron, vinclozolin, procimidone, p,p'DDE), un potente inibitore della 5α riduttasi (finasteride) e due sostanze chimiche negative note (dinitrofenolo e nonilfenolo) (4) (5) (6) (7) (8). Questo metodo di prova, oltre ad essere il risultato della lunga esperienza storica nell'uso del saggio, si fonda sull'esperienza acquisita con il programma di validazione della prova e sui relativi risultati.

2. Il saggio di Hershberger è una prova di screening a breve termine in vivo che impiega tessuti accessori dell'apparato genitale maschile. Risale agli anni '30 ed è stato modificato negli anni '40 includendovi i muscoli dell'apparato genitale maschile che rispondono agli androgeni (2) (9-15). Negli anni '60 sono stati valutati oltre 700 potenziali androgeni per mezzo di una versione standardizzata del protocollo (2) (14), ed è in questo periodo che il saggio si configura come metodo standard sia per gli androgeni che per gli antiandrogeni (2) (15). L'attuale versione si basa sulle variazioni di peso di cinque tessuti androgeno-dipendenti nel ratto maschio peripuberale castrato. Esso valuta la capacità di una sostanza chimica di stimolare le attività biologiche analoghe a quelle indotte dagli agonisti e dagli antagonisti degli androgeni o dagli inibitori della 5α-riduttasi. I cinque tessuti bersaglio androgeno-dipendenti esaminati nel presente metodo sono la prostata ventrale, le vescicole seminali (con i relativi fluidi e ghiandole della coagulazione), il muscolo elevatore dell'ano con il bulbocavernoso, la coppia di ghiandole bulbouretrali e il glande. Nel ratto maschio peripuberale castrato questi cinque tessuti rispondono tutti agli androgeni con un aumento del peso assoluto. Se stimolati affinché aumentino di peso mediante somministrazione di un potente androgeno di riferimento, questi cinque tessuti rispondono agli antiandrogeni con una diminuzione del peso assoluto. Il primo modello per questo saggio è il maschio peripuberale castrato chirurgicamente, che è stato convalidato nelle fasi 1, 2 e 3 del programma di validazione di Hershberger.

3. Il saggio di Hershberger è utilizzato come prova meccanicistica di screening in vivo degli agonisti degli androgeni, degli antagonisti degli androgeni e degli inibitori della 5a-riduttasi e la sua applicazione va vista nel contesto del «Quadro concettuale dell'OCSE per la sperimentazione e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino» (appendice 2). In questo quadro concettuale il saggio di Hershberger figura al livello 3 come

▼M5

saggio in vivo che fornisce dati riguardo a un unico meccanismo endocrino, ovvero l'attività (anti)androgenica. Questo saggio è destinato a far parte di una batteria di prove in vitro e in vivo concepita per individuare le sostanze chimiche potenzialmente in grado di interagire con il sistema endocrino, e consentire di valutarne i pericoli e i rischi per la salute umana o per l'ambiente.

4. Per evitare la castrazione, in un'ottica di attenzione al benessere degli animali, si è cercato un modello alternativo nel maschio svezzato intatto (non castrato) sottoposto a stimolazione. Il metodo con il maschio svezzato stimolato è stato convalidato (24), sebbene negli studi di validazione questa versione del saggio di Hershberger non sia parsa sempre in grado di evidenziare, alle dosi testate, gli effetti delle sostanze a debole attività antiandrogenica sul peso degli organi androgeno-dipendenti. Questo modello non è stato perciò incluso nel presente metodo di prova. Tuttavia, tenuto conto che il suo uso non solo è positivo in termini di benessere degli animali, ma può anche fornire informazioni su altri modi di azione, esso è illustrato nel documento d'orientamento dell'OCSE n. 115 (25).

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

5. Gli agonisti e gli antagonisti degli androgeni fungono da ligandi dei recettori androgenici e possono, rispettivamente, attivare o inibire la trascrizione del gene regolata dal recettore. Alcune sostanze chimiche, inoltre, inibiscono la conversione del testosterone in diidrotestosterone, l'androgeno naturale più potente, a livello di alcuni tessuti bersaglio degli androgeni (inibitori della 5a-riduttasi). Tali sostanze possono avere effetti indesiderati sulla salute, in particolare sulla riproduzione e sullo sviluppo. È pertanto necessario, a fini di regolamentazione, potere esaminare e valutare rapidamente l'eventuale attività agonista o antagonista degli androgeni o inibitrice della 5a-riduttasi. esplicata da una sostanza chimica. Sebbene apporti informazioni utili, l'affinità di un ligando per un recettore androgenico misurata dal suo legame con il recettore oppure l'attivazione della trascrizione di geni reporter in vitro non sono gli unici fattori che possono determinare un eventuale pericolo. Altri determinanti possono essere l'attivazione e la disattivazione metabolica dopo l'ingresso della sostanza chimica nell'organismo, la sua distribuzione nei tessuti bersaglio e l'eliminazione dall'organismo, ed è perciò necessario indagare l'eventuale attività di una sostanza chimica in vivo, in condizioni sperimentali e di esposizione idonee. La valutazione in vivo è meno utile se le caratteristiche chimiche della sostanza relative all'assorbimento, alla distribuzione, al metabolismo e all'eliminazione (ADME) sono note. I tessuti androgeno-dipendenti rispondono con una crescita rapida e vigorosa alla stimolazione con androgeni, in particolare nei ratti maschi prepuberali castrati. I roditori, in particolare il ratto, sono ampiamente utilizzati anche negli studi di tossicità per la caratterizzazione dei pericoli. Pertanto, la versione del saggio che utilizza il ratto prepuberale castrato e i cinque tessuti bersaglio è adatta per lo screening in vivo degli agonisti e degli antagonisti degli androgeni e degli inibitori della 5a-riduttasi.

6. Il presente metodo di prova si basa sui protocolli impiegati nello studio di validazione dell'OCSE che si sono dimostrati affidabili e riproducibili negli studi intra e interlaboratorio (4)(5)(6)(7)(8). Il presente metodo contempla sia il protocollo per gli androgeni sia quello per gli antiandrogeni.

7. Sebbene nel programma di validazione dell'OCSE del saggio di Hershberger la dose di TP utilizzata dai vari laboratori non fosse la stessa (0,2 e 0,4 mg/kg/giorno, per iniezione sottocutanea), poche sono le differenze constatate nella capacità di queste due varianti del protocollo di rilevare l'attività antiandrogenica, sia debole che forte. È però evidente che la dose di TP non deve essere troppo elevata da bloccare gli effetti degli antagonisti deboli dei recettori per gli androgeni o troppo bassa da indurre una crescita scarsa dei tessuti androgenici, anche senza concomitante somministrazione di antiandrogeni.

▼M5

8. La crescita dei tessuti androgeno-dipendenti non è una risposta unicamente di origine androgenica; anche altri fattori, diversi dagli agonisti degli androgeni, possono alterare il peso di alcuni tessuti. La crescita simultanea di vari tessuti corrobora però l'ipotesi di un meccanismo più specifico di natura androgenica. Ad esempio, somministrando dosi elevate di estrogeni potenti si è osservato un aumento ponderale delle vescicole seminali, ma non degli altri tessuti androgeno-dipendenti. Le sostanze chimiche antiandrogeniche possono fungere da antagonisti dei recettori per gli androgeni oppure da inibitori della 5a-riduttasi. L'effetto prodotto dagli inibitori della 5a-riduttasi è variabile, perché la conversione nel più potente diidrotestosterone dipende dal tipo di tessuto. Gli antiandrogeni che inibiscono la 5α — riduttasi, come la finasteride, hanno effetti più marcati nella prostata ventrale rispetto a un potente antagonista di recettori per gli androgeni, come il flutamide. Questa differenza di risposta dei tessuti può servire per distinguere i modi di azione mediati dai recettori androgenici da quelli mediati dalla 5α-riduttasi. Inoltre, il recettore dell'androgeno è imparentato, in termini di evoluzione, con quello di altri ormoni steroidei, e vi sono alcuni altri ormoni che, se somministrati a dosi elevate suprafisiologiche, possono legarsi con esso e contrastare gli effetti d'attivazione della crescita indotti dal TP (13). È altresì plausibile che un metabolismo steroideo più intenso e il conseguente calo del tenore sierico di testosterone possano ridurre la crescita dei tessuti androgeno-dipendenti. Pertanto, l'esito positivo del saggio di Hershberger deve di norma essere valutato adottando un approccio basato sulla forza probante dei dati, che prevede saggi in vitro, quali i saggi di legame al recettore estrogenico e al recettore androgenico e relativi saggi di attivazione della trascrizione, altri saggi in vivo che esaminano analoghi tessuti bersaglio degli androgeni, come il saggio sul maschio in età puberale, il saggio di 15 giorni sul maschio adulto intatto o gli studi a dosi ripetute su 28 o 90 giorni.

9. L'esperienza mostra che gli androgeni xenobiotici sono più rari degli antiandrogeni xenobiotici. Si prevede quindi che il saggio di Hershberger sia utilizzato principalmente per lo screening degli antiandrogeni, sebbene se ne possa raccomandare l'applicazione anche agli androgeni nel caso delle sostanze chimiche steroidee o sostanze analoghe agli steroidi, come pure per le sostanze chimiche per le quali i metodi dei livelli 1 o 2 del quadro concettuale (appendice 2) hanno indicato possibili effetti androgenici. Analogamente, le prove di livello 5 permettono di osservare effetti indesiderati associati a profili (anti)androgenici, il che comporta la necessità di valutare se la sostanza chimica in causa agisce per via endocrina.

10. Tutti i protocolli che prevedono l'uso di animali rispetteranno le norme locali in materia di benessere animale; le descrizioni delle cure e del trattamento che figurano in appresso costituiscono norme minime, alle quali si sostituiranno le regolamentazioni locali, ad esempio la direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (26). Ulteriori orientamenti relativi al trattamento degli animali nel rispetto delle norme etiche sono stati formulati dall'OCSE (17).

11. Come per ogni saggio che utilizza animali da esperimento, occorre valutare attentamente la necessità di effettuare il presente studio. Fondamentalmente sono due le ragioni che possono giustificare tale decisione:

— potenziale di esposizione elevato (livello 1 del quadro concettuale) oppure elementi indicanti attività (anti)androgenica ricavati da saggi in vitro (livello 2), tali da rendere necessario investigare se tali effetti si possono produrre in vivo;

— effetti di natura (anti)androgenica in saggi in vivo di livello 4 o 5, tali da rendere necessario investigare il modo d'azione specifico, ad esempio, per determinare se gli effetti sono dovuti a un meccanismo (anti)androgenico.

▼M5

12. Le definizioni dei termini utilizzati nel presente metodo di prova sono contenute nell'appendice 1.

PRINCIPIO DEL SAGGIO

13. La sensibilità del saggio di Hershberger si fonda sull'utilizzazione di maschi con produzione minima di androgeni endogeni. A tal fine si impiegano animali castrati, lasciando trascorrere un periodo dalla castrazione che permetta ai tessuti bersaglio di tornare a un peso di riferimento minimo e uniforme. Pertanto, quando si ricerca una potenziale attività androgenica, i livelli endogeni di androgeni in circolazione sono bassi, l'asse ipotalamo-ipofisario-gonadico è incapace di compensarli con meccanismi di retroregolazione, la capacità di risposta dei tessuti è massima e la variabilità del peso iniziale dei tessuti è minima. Quando si ricerca una potenziale attività antiandrogenica, si ottiene un maggior aumento ponderale dei tessuti se li si stimola con un androgeno di riferimento. Il saggio di Hershberger richiede quindi solo 6 animali per gruppo-dose, mentre per altri saggi che utilizzano maschi puberali o adulti intatti il numero consigliato è di 15 maschi per gruppo-dose.

14. La castrazione dei ratti maschi in età peripuberale deve essere fatta in modo idoneo, con l'impiego di tecniche autorizzate di anestesia e asepsi. Per eliminare i disturbi post operatori, nei primi giorni successivi all'intervento si somministrano analgesici. La castrazione migliora la precisione con la quale il saggio rileva gli androgeni e gli antiandrogeni deboli, sopprimendo, innanzitutto, i meccanismi compensatori di retroregolazione endocrina che esistono nell'animale intatto e che possono attenuare gli effetti degli androgeni e degli antiandrogeni somministrati, in secondo luogo eliminando la grande variabilità del tenore sierico di testosterone da un individuo all'altro. Pertanto, la castrazione riduce il numero di animali necessari per ricercare le attività endocrine in oggetto.

15. Nello screening di un'attività androgenica potenziale, la sostanza in esame è somministrata ogni giorno, per un periodo di 10 giorni consecutivi, tramite sonda orogastrica o per iniezione sottocutanea. Le sostanze in esame sono somministrate ad almeno due gruppi di animali da esperimento, esponendo ogni gruppo a un livello di dose Gli animali sono sottoposti ad autopsia circa 24 ore dopo l'ultima dose. Un aumento ponderale statisticamente significativo di due o più organi bersaglio nei gruppi che ricevono la sostanza rispetto al gruppo di controllo che riceve il mezzo disperdente è indice di attività androgenica potenziale della sostanza chimica in esame (cfr. paragrafo 60). Gli androgeni come il trenbolone, che non subiscono l'azione della 5α-riduttasi, producono effetti più pronunciati sul muscolo elevatore dell'ano, sul bulbocavernoso e sul glande rispetto al TP, sebbene un accrescimento debba rilevarsi in tutti i tessuti.

16. Nello screening di un'attività antiandrogenica potenziale, la sostanza in esame è somministrata ogni giorno, per un periodo di 10 giorni consecutivi, tramite sonda orogastrica o per iniezione sottocutanea, insieme a dosi giornaliere di TP (0,2 o 0,4 mg/kg/giorno) per iniezione sottocutanea. Dato che il programma di validazione ha dimostrato l'efficacia di entrambe le suddette dosi di TP nella ricerca di antiandrogeni, il saggio va effettuato scegliendo una delle due. La sostanza in esame è somministrata in dosi scalari ad almeno tre gruppi di animali, esponendo ogni gruppo a un livello di dose. Gli animali sono sottoposti ad autopsia circa 24 ore dopo l'ultima dose. Un calo ponderale statisticamente significativo di due o più organi bersaglio nei gruppi che ricevono la sostanza e il TP, rispetto al gruppo di controllo che riceve solo TP, è indice di attività antiandrogenica potenziale della sostanza chimica in esame (cfr. paragrafo 61).

▼M5

DESCRIZIONE DEL METODO

Selezione della specie e del ceppo

17. L'uso del ratto come specie di routine per il saggio di Hershberger risale agli anni '30. Benché sul piano biologico sia plausibile che il ratto e il topo rispondano in modo simile, nel saggio di Hershberger si preferisce utilizzare il ratto proprio grazie ai 70 anni di esperienza acquisita con questo modello. Inoltre, poiché i dati del saggio di Hershberger possono servire da risultati preliminari per uno studio multigenerazionale a lungo termine, è possibile utilizzare animali della stessa specie, dello stesso ceppo e della stessa provenienza in entrambi gli studi.

18. Questo protocollo lascia al laboratorio la facoltà di scegliere il ceppo di ratto da utilizzare nel saggio, che sarà in genere quello da esso abitualmente impiegato. Si possono scegliere i ceppi di ratto di uso comune nei laboratori, evitando però i ceppi che giungono a maturità oltre il 42° giorno di vita, dato che la castrazione dei maschi al 42° giorno può impedire la determinazione del peso del glande, che può essere effettuata soltanto dopo la separazione del prepuzio dal corpo del pene. Salvo in rare eccezioni, non si utilizzano pertanto i ceppi derivati dal ratto Fisher 344, il cui sviluppo sessuale ha una cronologia diversa da quella degli altri ceppi usati più comunemente, come Sprague Dawley o Wistar (16). Se vi è la necessità di utilizzare questo ceppo, il laboratorio dovrà castrare gli individui ad un'epoca leggermente posteriore e dimostrare la sensibilità del ceppo utilizzato. Il laboratorio deve motivare con chiarezza la scelta del ceppo di ratto. Se il saggio di screening è preliminare a uno studio a dose ripetuta per via orale, a uno studio sulla riproduzione e sullo sviluppo, o a uno studio a lungo termine, occorre usare di preferenza, in tutti gli studi, animali provenienti dallo stesso ceppo e aventi la medesima origine.

Condizioni di stabulazione e alimentazione

19. Tutte le procedure devono essere conformi agli standard locali in materia di cura degli animali sperimentali. Le cure e il trattamento qui descritti costituiscono norme minime alle quali si sostituiranno regolamentazioni locali più rigorose, ad esempio la direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 settembre 2010, sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici (26). La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve mantenersi intorno al 50-60 %; in ogni caso non deve essere inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale con un fotoperiodo di 12:12 (luce/buio).

20. La stabulazione in gabbie collettive è preferibile all'isolamento a causa della giovane età degli animali e per il fatto che i ratti sono animali socievoli. Alloggiando due o tre animali per gabbia si evita l'affollamento e lo stress che ne deriva e che può interferire con la regolazione ormonale dello sviluppo del tessuto sessuale accessorio. Le gabbie devono essere accuratamente pulite per eliminare i possibili contaminanti e sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. La scelta di gabbie di congrue dimensioni (circa 2 000 cm^2) eviterà l'affollamento.

21. Ogni animale è identificato individualmente (ad esempio, con un marchio o un'etichetta sull'orecchia) con metodo non cruento. Il metodo di identificazione deve essere indicato nella relazione.

▼M5

22. Gli animali ricevono a volontà dieta da laboratorio e acqua da bere. Il laboratorio utilizza nel saggio di Hershberger la dieta da laboratorio che normalmente impiega nella sperimentazione sulle sostanze chimiche. Negli studi di validazione del saggio, non sono stati osservati effetti né variabilità imputabili alla dieta. Il tipo di dieta utilizzata deve essere indicata nella relazione e un campione del mangime somministrato deve essere conservato per eventuali analisi che potrebbero essere necessarie in un secondo tempo.

Criteri di prestazione relativi al peso degli organi androgeno-dipendenti

23. Durante lo studio di validazione non è emerso alcun dato comprovante che un calo del peso corporeo incida sull'aumento o sulla diminuzione della crescita ponderale dei tessuti bersaglio (ossia, dei tessuti che devono essere pesati nel presente studio).

24. Tra i vari ceppi di ratto utilizzati con successo nel programma di validazione, il peso degli organi androgeno-dipendenti era più elevato nei ceppi più corpulenti che in quelli più leggeri. Pertanto, i criteri di prestazione del saggio di Hershberger non comprendono il peso assoluto degli organi previsto per i controlli negativi e positivi.

25. Poiché il coefficiente di variazione (CV) per un tessuto è inversamente proporzionale alla potenza statistica, i criteri di prestazione del saggio di Hershberger sono basati su valori massimi di CV per ogni tessuto (tabella 1). I CV sono tratti dagli studi di validazione dell'OCSE. In caso di esito negativo, il laboratorio deve esaminare i CV del gruppo di controllo e del gruppo trattato con la dose più elevata per determinare se sono stati superati i criteri di prestazione relativi al CV massimo.

26. Lo studio dovrà essere ripetuto quando: 1) almeno tre dei dieci possibili CV individuali nel gruppo di controllo e in quello trattato con la dose elevata superano i valori massimi indicati nella tabella 1 per gli studi sugli agonisti e sugli antagonisti; e 2) almeno due tessuti bersaglio sono marginalmente non significativi, ossia, presentano valori r compresi tra 0,05 e 0,10.

Tabella 1

CV massimi ammessi, determinati per i tessuti sessuali accessori bersaglio nel modello animale castrato negli studi di validazione dell'OCSE ([1])

Tessuto	Effetti antiandrogenici	Effetti androgenici
Vescicole seminali	40 %	40 %
Prostata ventrale	40 %	45 %
Muscolo elevatore dell'ano con bulbocavernoso	20 %	30 %
Ghiandole bulbouretrali	35 %	55 %
Glande	17 %	22 %

([1]) Il CV massimo per ciascun tessuto è stato determinato in base a un grafico dei valori CV — disposti in ordine crescente — che riprende tutte le medie di tutti gli esperimenti condotti nell'esercizio di validazione utilizzando un determinato modello (agonista o antagonista). Si è considerato che il CV massimo corrispondesse al punto, detto valore soglia, a partire dal quale gli incrementi tra i CV immediatamente più alti della serie diventavano nettamente maggiori di quelli esistenti tra i CV immediatamente anteriori della serie. Va osservato che, sebbene questa analisi abbia consentito di individuare valori soglia relativamente affidabili per il modello antagonista del saggio, le curve del CV nel saggio sugli agonisti hanno mostrato incrementi più uniformi, per cui i CV massimi identificati con tale metodo sono alquanto arbitrari.

▼M5

PROTOCOLLO

Rispetto della normativa e verifica del laboratorio

27. A differenza del saggio uterotrofico (capitolo B.54 del presente allegato), per il saggio di Hershberger non è necessario dimostrare la competenza del laboratorio prima dell'inizio dello studio, perché il saggio prevede l'esecuzione concomitante di una prova di controllo positivo (testosterone propionato e flutamide) e negativo.

Numero e condizione degli animali

28. Ogni gruppo trattato e ogni gruppo di controllo deve essere composto di almeno 6 animali. Ciò vale sia per il protocollo androgenico che per quello antiandrogenico.

Castrazione

29. Dopo il ricevimento degli animali, occorre prevedere un periodo di acclimatazione iniziale di svariati giorni, per assicurarsi che siano sani e vitali. Poiché gli animali castrati prima del 42° giorno di età o il 42° giorno postnatale non sempre presentano separazione prepuziale, la castrazione deve essere effettuata il 42° giorno postnatale o successivamente, ma non prima. Gli animali sono castrati sotto anestesia, incidendo lo scroto e asportando entrambi i testicoli e gli epididimi, con legamento dei vasi sanguigni e dei dotti deferenti. Dopo aver escluso la presenza di emorragia, si chiude lo scroto con sutura o clip. Per alleviare i disturbi post operatori, nei primi giorni successivi all'intervento si somministrano analgesici. Se gli animali sono acquistati già castrati da un fornitore, quest'ultimo ne garantirà l'età e lo stadio di maturazione sessuale.

Acclimatazione dopo la castrazione

30. Il periodo di acclimatazione degli animali alle condizioni di laboratorio è di almeno 7 giorni dopo la castrazione, per permettere la regressione ponderale dei tessuti bersaglio. Gli animali sono osservati quotidianamente e quelli che mostrano segni di malattia o anomalie fisiche sono ritirati. La somministrazione delle dosi allo studio può quindi iniziare a partire dal 49° giorno d'età, ma non oltre il 60°. Al momento dell'autopsia l'animale non deve avere più di 70 giorni. Questo grado di flessibilità consente al laboratorio una programmazione efficiente del proprio lavoro sperimentale.

Peso corporeo e randomizzazione dei gruppi

31. Le differenze del peso corporeo individuale sono una fonte di variabilità del peso tissutale, sia all'interno che tra i gruppi di animali. Una grande variabilità del peso dei tessuti si traduce in un maggiore coefficiente di variazione (CV) e in una minore potenza statistica del saggio (talvolta denominata «sensibilità del saggio»). È pertanto opportuno limitare le variazioni del peso corporeo, sia sul piano sperimentale che su quello statistico.

32. Sul piano sperimentale, occorre sforzarsi di ridurre le variazioni del peso corporeo all'interno e tra i gruppi in esame. In primo luogo, gli animali di taglia fuori norma non devono partecipare allo studio di coorte. All'inizio dello studio le variazioni di peso tra gli animali non superano ± 20 % del peso medio (ad esempio, 175 g ± 35 g per i ratti peripuberali castrati). In secondo luogo, gli animali sono assegnati ai gruppi (di controllo e di trattamento) in maniera aleatoria, in modo che non vi sia alcuna differenza statistica tra il peso corporeo medio dei vari gruppi. Occorre indicare nella relazione il protocollo di randomizzazione a blocchi utilizzato.

▼M5

33. Poiché la tossicità può ridurre il peso corporeo dei gruppi trattati rispetto a quello del gruppo di controllo, è possibile impiegare come covariabile statistica il peso corporeo rilevato il primo giorno di somministrazione della sostanza chimica in esame, e non il peso corporeo al momento dell'autopsia.

Dosaggio

34. Per stabilire se una sostanza chimica può avere un'azione androgenica in vivo, in genere è sufficiente allestire due gruppi-dose della sostanza in esame, un gruppo di controllo positivo e un gruppo di controllo del mezzo disperdente (negativo) (cfr. paragrafo 43): è questo il disegno sperimentale da preferirsi per motivi dettati dal benessere degli animali. Se lo scopo è di ottenere una curva della relazione dose-risposta o di estrapolare i risultati per applicarli a dosi più basse, sono necessari almeno 3 gruppi-dose. Se si desidera ottenere informazioni più particolareggiate sull'attività androgenica (quali una stima dell'efficacia) occorre prevedere un altro schema di dosaggio. Se lo studio verte sugli antiandrogeni, la sostanza chimica in esame viene somministrata insieme a un agonista dell'androgeno di riferimento. Si utilizzano almeno 3 gruppi sperimentali con diverse dosi della sostanza in esame, un controllo positivo e un controllo negativo (cfr. paragrafo 44). Fatta eccezione per la somministrazione della sostanza da esaminare, gli animali del gruppo di controllo devono essere manipolati in modo identico a quelli dei gruppi che ricevono il trattamento. Se la sostanza è somministrata con un mezzo disperdente, il volume del mezzo disperdente somministrato al gruppo di controllo sarà quello massimo utilizzato per i gruppi-dose.

35. Tutti i livelli di dose devono essere proposti e scelti tenendo conto degli eventuali dati esistenti sulla tossicità e sulla (tossico-)cinetica della sostanza in esame o di sostanze affini. Il livello di dose più elevato deve essere stabilito innanzitutto in base alla DL_{50} e/o alle informazioni sulla tossicità acuta, onde evitare il decesso, sofferenze gravi o distress degli animali (17)(18)(19)(20) e, in secondo luogo, tenendo conto delle informazioni disponibili sulle dosi utilizzate negli studi subcronici e cronici. In generale, la dose più elevata non deve provocare una riduzione del peso corporeo finale degli animali superiore al 10 % del peso dei controlli. La dose più elevata equivale alla dose inferiore tra le due seguenti: 1) la dose più elevata che garantisce la sopravvivenza dell'animale e che non induce tossicità né distress significativi dopo 10 giorni consecutivi di somministrazione, fino ad una dose massima di 1 000 mg/kg/giorno (cfr. paragrafo 36); 2) una dose che induce effetti (anti)androgenici. Per uno screening, sono ammessi intervalli ampi tra i livelli di dose (ad esempio, mezza unità logaritmica, che equivale a un fattore di progressione di 3,2, o persino 1 unità logaritmica). In mancanza di dati utili al riguardo, si può condurre uno studio per identificare il range di dosi utilizzabili (cfr. paragrafo 37).

Dose limite

36. Se in un saggio, condotto secondo i protocolli descritti per il presente studio, la dose limite di 1 000 mg/kg di peso corporeo al giorno e una dose inferiore non producono cambiamenti statisticamente significativi nel peso degli organi sessuali, si può ritenere inutile analizzare altri livelli di dose. Il concetto di dose limite si applica in tutti i casi tranne quando i dati sull'esposizione umana indicano la necessità di utilizzare un livello di dose più elevato.

Studio per la determinazione del range di dosi

37. Se necessario, è possibile effettuare uno studio preliminare con pochi animali per individuare il range di dosi e scegliere così i gruppi-dose appropriati [avvalendosi dei metodi per le prove di tossicità acuta, di cui ai capitoli B.1 *bis*, B.1 *ter* del presente allegato (27), e alla linea guida OCSE n. 425 (19)]. L'obiettivo, nel caso di un saggio di Hershberger, è di scegliere delle dosi che garantiscano la sopravvivenza degli animali e non

▼M5

inducano tossicità né distress significativi dopo dieci giorni consecutivi di somministrazione della sostanza chimica, fino a una dose limite di 1 000 mg/kg/giorno, come indicato nei paragrafi 35 e 36. A tale riguardo, può essere utile consultare il documento di orientamento dell'OCSE (17), che definisce i segni clinici di tossicità o distress negli animali. Se tale studio preliminare lo consente, dopo dieci giorni di trattamento i tessuti bersaglio possono essere escissi e pesati a circa 24 ore dall'ultima dose. Tali dati potrebbero poi essere utilizzati per facilitare la scelta delle dosi nello studio principale.

Sostanze chimiche di riferimento e mezzo disperdente

38. L'agonista androgenico di riferimento è il testosterone propionato (TP), n. CAS 57-82-5. La dose di TP di riferimento è pari a 0,2 o 0,4 mg/kg di peso corporeo/giorno. L'antagonista androgenico di riferimento è il flutamide (FT), n. CAS 1311-84-7. La dose di FT di riferimento è pari a 3 mg/kg di peso corporeo/giorno, da somministrare insieme alla dose di TP riferimento.

39. Si raccomanda di considerare in primo luogo, ogniqualvolta possibile, l'uso di una soluzione/sospensione acquosa. Dato però che molti ligandi degli androgeni o i loro precursori metabolici tendono ad essere idrofobi, normalmente si utilizza una soluzione/sospensione oleosa (ad esempio, olio di mais, di arachidi, di sesamo o d'oliva). Le sostanze in esame possono essere disciolte in una quantità minima di etanolo 95 % o di altri solventi idonei, poi diluite nel mezzo disperdente prescelto alle concentrazioni finali desiderate. Le caratteristiche tossiche del solvente devono essere note e testate su un gruppo di controllo a parte trattato unicamente con il solvente. Se la sostanza in esame è considerata stabile, se ne può favorire la solubilizzazione riscaldandola leggermente e sottoponendola ad una azione meccanica vigorosa. È necessario determinare la stabilità della sostanza chimica in esame nel mezzo disperdente. Se la sostanza in esame rimane stabile per tutta la durata dello studio, se ne prepara inizialmente un'aliquota, dopodiché giorno per giorno si preparano le diluizioni specifiche, facendo attenzione a che i campioni non vengano contaminati e deteriorati.

Somministrazione delle dosi

40. Il TP è somministrato per iniezione sottocutanea, e il FT mediante sonda orogastrica.

41. La sostanza chimica è somministrata tramite sonda orogastrica o per iniezione sottocutanea. Quando si sceglie la via di somministrazione occorre tener conto sia del benessere degli animali sia delle proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica in esame. Inoltre, nel caso si ottengano risultati positivi per iniezione, prima di avviare una ricerca approfondita a lungo termine, vanno considerati vari aspetti tossicologici, quali l'attinenza con la via di esposizione umana alla sostanza chimica (sonda orogastrica per un'esposizione tramite ingestione, iniezione sottocutanea per un'esposizione mediante inalazione o assorbimento cutaneo), così come le informazioni tossicologiche e i dati metabolici e cinetici (ad esempio, la necessità di evitare il metabolismo di primo passaggio, una migliore efficacia di una determinata via di somministrazione).

42. Gli animali ricevono le dosi alla stessa maniera e secondo la stessa cronologia, per dieci giorni consecutivi, a intervalli di circa 24 ore. Il livello di dosaggio è regolato tutti i giorni in base alle pesate giornaliere simultanee degli animali. Ogni giorno di esposizione si annotano il volume e l'ora della somministrazione della dose. Per poter interpretare correttamente i dati occorre fare attenzione a non superare la dose massima indicata al paragrafo 35, valutando scrupolosamente a tal fine tutti gli elementi osservati, in particolare la riduzione del peso corporeo e i segni clinici. La somministrazione orale forzata è effettuata mediante sonda gastrica o idonea

▼M5

cannula per intubazione. Il volume massimo di liquido che può essere somministrato in una sola volta dipende dalla taglia dell'animale e dalle linee guida locali sulla cura degli animali, ma in ogni caso non deve essere superiore a 5 ml/kg di peso corporeo, salvo nel caso di soluzioni acquose, delle quali se ne possono somministrare 10 ml/kg di peso corporeo. Per quanto riguarda le iniezioni sottocutanee, le dosi sono iniettate nella regione dorsoscapolare o lombare con ago sterile (di calibro 23 o 25) e una siringa da insulina. La rasatura del sito di iniezione è facoltativa. Le eventuali perdite e fuoriuscite di liquido al momento dell'iniezione o una somministrazione incompleta devono essere registrate. Il volume complessivo giornaliero iniettato per ratto non supera 0,5 ml/kg di peso corporeo.

Protocollo specifico per gli agonisti degli androgeni

43. Nella prova per gli agonisti degli androgeni, il mezzo disperdente è il controllo negativo e il gruppo trattato con il TP è il controllo positivo. L'attività biologica analoga a quella indotta dagli agonisti degli androgeni si ricerca somministrando una sostanza chimica ai gruppi prescelti, alle dosi prescelte, per 10 giorni consecutivi. Il peso dei cinque tessuti sessuali accessori dei gruppi che ricevono la sostanza in esame è paragonato a quello del gruppo che riceve il mezzo disperdente al fine di determinare aumenti di peso statisticamente significativi.

Protocollo specifico per gli antagonisti degli androgeni e gli inibitori della 5α-reduttasi

44. Nella prova per gli antagonisti degli androgeni e gli inibitori della 5α-reduttasi, il gruppo trattato con il TP è il controllo negativo e il gruppo trattato simultaneamente con dosi di riferimento di TP e FT è il controllo positivo. L'attività biologica analoga a quella indotta dagli antagonisti degli androgeni e dagli inibitori della 5α-reduttasi si ricerca somministrando la dose di riferimento di TP e la sostanza chimica per 10 giorni consecutivi. Il peso dei cinque tessuti sessuali accessori dei gruppi che ricevono il TP e la sostanza in esame è paragonato a quello del gruppo che riceve solo il TP di riferimento al fine di determinare diminuzioni di peso statisticamente significative.

OSSERVAZIONI

Osservazioni cliniche

45. Almeno una volta al giorno si eseguono osservazioni cliniche generali, con più frequenza se si constatano segni di tossicità. Le osservazioni sono effettuate di preferenza alla stessa ora e tenendo conto del momento in cui si prevede che gli effetti siano più evidenti dopo la somministrazione delle dosi. Tutti gli animali sono osservati per controllare la mortalità, la morbilità e segni clinici generali quali alterazioni del comportamento, della cute, del pelo, degli occhi, delle mucose, comparsa di secrezioni ed escrezioni e l'attività autonomica (ad esempio lacrimazione, piloerezione, ampiezza pupillare, alterazioni della respirazione).

46. Gli animali trovati morti sono rimossi ed eliminati senza ulteriore analisi dei dati. La mortalità, di qualsiasi natura, degli animali prima dell'autopsia va indicata nella relazione insieme alle eventuali cause apparenti. Gli animali moribondi devono essere soppressi con metodi non cruenti e riportati nella relazione, insieme alle cause apparenti della morbilità.

▼M5

Peso corporeo e consumo alimentare

47. Tutti gli animali sono pesati quotidianamente (peso espresso in grammi, arrotondato al primo decimale), a partire da appena prima l'inizio del trattamento, ossia al momento dell'assegnazione degli animali ai gruppi. A titolo facoltativo, si può misurare anche la quantità di cibo consumata durante il periodo del trattamento in ciascuna gabbia, pesando i contenitori di cibo. I dati sul consumo alimentare sono espressi in grammi per ratto al giorno.

Dissezione e pesatura dei tessuti e degli organi

48. Circa 24 ore dopo l'ultima somministrazione della sostanza chimica in esame, i ratti sono sacrificati e dissanguati, secondo le normali procedure del laboratorio che esegue la prova, e sottoposti ad autopsia. Il metodo impiegato per l'eutanasia è riportato nella relazione del laboratorio.

49. Idealmente, l'ordine nel quale i gruppi di animali sono sottoposti ad autopsia è aleatorio e non segue l'ordine crescente o decrescente delle dosi, perché ciò potrebbe influire sui dati. Il reperto dell'autopsia, vale a dire, alterazioni patologiche/lesioni visibili, va riferito nella relazione.

50. Si pesano i cinque tessuti androgeno-dipendenti (prostata ventrale, vescicole seminali, muscolo elevatore dell'ano con bulbocavernoso, coppia di ghiandole bulbouretrali, glande). Per fare ciò, i tessuti sono escissi, accuratamente liberati da eventuali tessuti aderenti e grasso in eccesso e sono pesati (peso fresco dei tessuti non fissati). Ogni tessuto deve essere manipolato con particolare cura per evitare perdita di fluidi e disidratazione, che potrebbero introdurre errori significativi e variabilità facendo risultare un peso inferiore. Alcuni di questi tessuti possono essere molto piccoli o difficili da dissezionare, il che dà luogo a variabilità. È quindi importante che chi effettua la dissezione dei tessuti sessuali accessori ne conosca bene la procedura standard. L'OCSE ha pubblicato un manuale di procedura operativa standard (SOP) per la dissezione (21) e una formazione rigorosa basata sulla suddetta procedura servirà a limitare una delle potenziali cause di variazione nello studio. Per evitare differenze nel trattamento dei tessuti, l'ideale sarebbe che ciascun tipo di tessuto fosse trattato dallo stesso dissettore. Se ciò non è possibile, l'autopsia deve essere allestita in modo da assegnare a ciascun dissettore la dissezione di un tipo tessuto in tutti i gruppi di trattamento, e non invece di tutti i tessuti di un gruppo di controllo o di un gruppo trattato. Ogni tessuto sessuale accessorio di ciascun animale è pesato senza essere prima tamponato e annotato, e il peso è espresso in mg arrotondato al primo decimale.

51. Alcuni di questi tessuti possono essere molto piccoli o difficili da sezionare, il che dà luogo a variabilità. Precedenti lavori hanno indicato che l'intervallo dei coefficienti di variazione (CV) dipende dalla competenza del laboratorio. In qualche caso all'interno dello stesso laboratorio si sono riscontrate grandi differenze tra il peso assoluto dei tessuti, in particolare la prostata ventrale e le ghiandole bulbouretrali.

52. Il peso del fegato, dei due reni e delle due ghiandole surrenali è una misurazione facoltativa. Anche questi tessuti vanno liberati da eventuali tessuti connettivali e dal grasso. Il peso del fegato è riferito in grammi, arrotondato al primo decimale, mentre quello della coppia di reni e di ghiandole surrenali è riferito in mg, arrotondato al primo decimale. Il fegato, il rene e le ghiandole surrenali non solo risentono dell'azione degli androgeni, ma forniscono anche indizi utili sulla tossicità sistemica.

▼M5

53. La misura dei livelli sierici di ormone luteinizzante (LH), ormone follicolo-stimolante (FSH) e testosterone (T) è facoltativa. I livelli sierici di testosterone sono utili per determinare se la sostanza in esame induce metabolismo epatico del testosterone, che ne fa abbassare i livelli sierici. Senza i dati relativi al testosterone, questo effetto potrebbe essere imputato a un meccanismo antiandrogenico. I livelli di LH forniscono informazioni sulla capacità di un antiandrogeno di ridurre non solo il peso degli organi, ma anche di influire sulla funzione ipotalamo-pituitaria, il che, secondo studi a lungo termine, può causare tumori ai testicoli. L'FSH è un ormone importante per la spermatogenesi. La misura dei livelli sierici di T4 e T3, anch'essa facoltativa, può fornire informazioni supplementari utili sulla capacità di interferire con l'omeostasi degli ormoni tiroidei. Per misurare i livelli ormonali, si anestetizza il ratto prima dell'autopsia per prelevarne il sangue mediante puntura cardiaca, scegliendo accuratamente il protocollo di anestesia affinché non influisca sulla misurazione degli ormoni. Occorre indicare nella relazione il metodo di preparazione del siero, la provenienza dei kit per il dosaggio radioimmunologico o per altre tecniche di misurazione, i protocolli analitici e i risultati ottenuti. I livelli di LH e i livelli di testosterone sono espressi in ng/ml di siero.

54. La dissezione dei tessuti, descritta di seguito, si basa su un manuale dettagliato sull'argomento, corredato di foto, pubblicato come supplemento del programma di validazione (21). Dalla pagina web della Food and Drug Administration coreana si può inoltre accedere a un video che presenta la procedura (22).

— Con la superficie ventrale dell'animale rivolta verso l'alto, determinare se il prepuzio del pene si è separato dal glande. In tal caso, ritrarre il prepuzio e asportare il glande, pesarlo e annotare il peso (in mg arrotondato al primo decimale);

— aprire la pelle e la parete addominale, in modo da esporre i visceri. Se si devono pesare anche gli organi facoltativi, asportare e pesare il fegato (valore espresso in grammi al primo decimale), asportare lo stomaco e gli intestini, asportare e pesare la coppia di reni e la coppia di ghiandole surrenali (peso espresso in mg al primo decimale). Questa dissezione espone la vescica e costituisce l'inizio della dissezione dei tessuti sessuali maschili accessori oggetto del presente saggio.

— Per sezionare la prostata ventrale, separare la vescica dalla lamina muscolare ventrale tagliando il tessuto connettivo lungo la linea mediana. Spostare la vescica in avanti verso le vescicole seminali, in modo da scoprire il lobo sinistro e quello destro della prostata ventrale (ricoperti da uno strato di grasso). Grattare con cura il grasso da entrambi i lobi della prostata ventrale. Spostare delicatamente il lobo destro della prostata ventrale dall'uretra e reciderlo. Tenendo fermo il lobo destro della prostata ventrale, spostare delicatamente il lobo sinistro dall'uretra e reciderlo; pesare e annotare il peso, in mg arrotondato al primo decimale.

— Per sezionare la vescicola seminale con le ghiandole della coagulazione, spostare la vescica in direzione caudale, in modo da esporre il dotto deferente, il lobo destro e quello sinistro delle vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione. Impedire la perdita di fluido applicando una pinza emostatica (clampaggio) alla base delle vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione, nel punto in cui il dotto deferente si unisce all'uretra. Recidere con cautela le vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione, mantenendo in posizione la pinza emostatica, eliminare il grasso e gli annessi, collocarle in una navicella per pesata tarata, ritirare la pinza emostatica e pesare, annotando poi il peso, espresso in mg al primo decimale.

▼M5

— Per sezionare il complesso formato dal muscolo elevatore dell'ano con il muscolo bulbocavernoso, è necessario esporre questi muscoli e la base del pene. L'elevatore dell'ano avvolge il colon, mentre i suoi fasci anteriori e il muscolo bulbocavernoso sono attaccati ai bulbi del pene. Asportare la pelle e gli annessi dalla regione perianale che si estende dalla base del pene all'estremità anteriore della ano. Recidere gradualmente il bulbocavernoso dal bulbo del pene e dai tessuti. Tagliare il colon in due, in modo da poter così recidere e asportare l'intera muscolatura formata dall'elevatore dell'ano e dal bulbocavernoso. Dopo averli ripuliti dal grasso e dagli annessi, pesare i muscoli, annotando poi il peso, espresso in mg al primo decimale.

— Dopo l'asportazione della muscolatura formata dall'elevatore dell'ano e dal bulbocavernoso, sono visibili le ghiandole bulbouretrali (o ghiandole di Cowper), di forma arrotondata, situate alla base dei bulbi del pene e in posizione leggermente dorsale. Occorre procedere alla dissezione con grande cautela, per evitare di tagliare inavvertitamente la sottile capsula e provocare una fuoriuscita di fluido. Pesare la coppia di ghiandole bulbouretrali e annotare il peso, in mg arrotondato al primo decimale.

— Riferire anche ogni eventuale fuoriuscita di fluido dalle ghiandole avvenuta durante l'autopsia e la dissezione.

55. Se la valutazione di una sostanza chimica richiede l'autopsia di un numero di animali superiore a quanto è ragionevole programmare per un solo giorno, l'inizio dello studio può essere ripartito su due giorni consecutivi, il che vale altrettanto per l'autopsia e le operazioni ad essa inerente. In questo tipo di programmazione, si deve utilizzare ogni giorno la metà degli animali per gruppo di trattamento.

56. Dopo l'autopsia, le carcasse devono essere smaltite in modo adeguato.

RELAZIONE

Dati

57. I dati, riassunti sotto forma di tabella, sono riferiti per individuo (ossia, peso corporeo, peso dei tessuti sessuali accessori, misurazioni facoltative e altre risposte e osservazioni) e per gruppo di animali (medie e deviazioni standard di tutte le misurazioni effettuate). I dati devono indicare il numero di animali all'inizio della prova, il numero degli animali trovati morti durante la prova o che hanno mostrato segni di tossicità, la descrizione dei segni di tossicità osservati, compresi il momento dell'insorgenza, la durata e la gravità.

58. La relazione finale deve contenere le seguenti informazioni.

Centro di saggio

— Nome del centro, ubicazione

— Direttore dello studio, altro personale e rispettive funzioni nello studio

— Date di inizio e fine dello studio, ossia, primo giorno di somministrazione della sostanza chimica in esame e ultimo giorno di autopsia

Sostanza chimica in esame

— Provenienza, numero di lotto/partita, identità, purezza, indirizzo completo del fornitore e caratterizzazione della sostanza chimica in esame

— Natura fisica e, se del caso, proprietà fisicochimiche

— Condizioni di stoccaggio, metodo e frequenza di preparazione delle diluizioni

— Qualsiasi dato ottenuto sulla stabilità

— Qualsiasi analisi delle soluzioni/sospensioni somministrate

▼**M5**

Mezzo disperdente

— Caratterizzazione del mezzo disperdente (identità, fornitore e numero di lotto)

— Giustificazione della scelta del mezzo disperdente (se diverso dall'acqua)

Animali sperimentali e protocolli di allevamento

— Specie/ceppo utilizzato e giustificazione della loro scelta

— Provenienza o fornitore degli animali, con indirizzo completo

— Numero ed età degli animali forniti

— Condizioni di stabulazione (temperatura, illuminazione ecc.)

— Dieta (nome, tipo, fornitore, numero di lotto, composizione e, se noti, livelli di fitoestrogeni)

— Lettiera (nome, tipo, fornitore, composizione)

— Condizioni di stabulazione e numero di animali per gabbia

Condizioni sperimentali

— Età alla castrazione e durata dell'acclimatazione dopo la castrazione

— Peso di ciascun animale all'inizio della prova (espresso in grammi, arrotondato al primo decimale)

— Processo di randomizzazione e registro dell'assegnazione ai gruppi trattati con il mezzo disperdente, con la sostanza di riferimento e con la sostanza in esame, nonché registro dell'assegnazione alle gabbie

— MEDIA e deviazione standard del peso corporeo per ciascun gruppo per ogni giorno di pesata durante tutto lo studio

— Motivazione della scelta delle dosi

— Via di somministrazione della sostanza chimica in esame e motivazione della scelta della via di esposizione

— Se si tratta di un saggio sull'antiandrogenicità, il trattamento con TP (dose e volume)

— Trattamento con la sostanza chimica in esame (dose e volume)

— Momento della somministrazione delle dosi

— Protocolli di autopsia, comprese le procedure di dissanguamento ed eventuale anestesia

— Se si eseguono analisi del siero, dettagli del metodo. Per esempio, se si utilizza il dosaggio radioimmunologico (RIA), occorre riferire il protocollo RIA, la provenienza del kit RIA, la data di scadenza del kit, il protocollo per il conteggio in scintillazione e la standardizzazione.

Risultati

— Osservazioni giornaliere per ciascun animale durante la somministrazione della sostanza in esame, in particolare:

— peso corporeo (in grammi, arrotondato al primo decimale),

— eventuali segni clinici,

— eventuali misurazioni o annotazioni sul consumo alimentare.

— Osservazioni autoptiche per ciascun animale, in particolare:

▼M5

— data dell'autopsia,

— gruppo di trattamento dell'animale,

— ID dell'animale,

— dissettore,

— giorno e ora dell'autopsia e della dissezione,

— età dell'animale,

— peso corporeo finale al momento dell'autopsia, segnalando eventuale aumento o calo ponderale statisticamente significativo,

— ordine del dissanguamento e della dissezione degli animali al momento dell'autopsia,

— peso dei cinque tessuti bersaglio androgeno-dipendenti:

— prostata ventrale (in mg, arrotondato al primo decimale),

— vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione, incluso il fluido (a coppia, in mg al primo decimale),

— insieme del muscolo elevatore dell'ano e del muscolo bulbocavernoso (in mg, al primo decimale),

— ghiandole bulbouretrali (a coppia, peso fresco in mg, al primo decimale),

— glande (peso fresco in mg, al primo decimale),

— peso dei tessuti facoltativi, se determinato:

— fegato (in grammi, al primo decimale),

— rene (a coppia, in mg, al primo decimale),

— ghiandola surrenale (a coppia, in mg, al primo decimale),

— osservazioni generali.

— Analisi degli ormoni sieriche, se effettuate:

  — LH sierico (facoltativo — ng/ml di siero), e

  — T sierico (facoltativo — ng/ml di siero),

— commenti generali.

Sintesi dei dati

I dati sono riassunti sotto forma di tabelle contenenti le dimensioni del campione per ciascun gruppo, la media del valore e l'errore standard della media o la deviazione standard. Nelle tabelle figurano il peso corporeo al momento dell'autopsia, le variazioni del peso corporeo tra l'inizio della somministrazione fino all'autopsia, il peso dei tessuti sessuali bersaglio accessori e il peso degli eventuali organi facoltativi.

Discussione dei risultati

Analisi dei risultati

59. Il peso corporeo e il peso dei singoli organi in sede di autopsia sono oggetto di un'analisi statistica volta a determinare parametri quali l'omogeneità della varianza, mediante congrue trasformazioni dei dati, laddove necessario. I gruppi che hanno ricevuto il trattamento sono confrontati con un gruppo di controllo utilizzando tecniche quali l'analisi ANOVA seguita da confronti a coppie (ad esempio, il test di Dunnett ad una coda) e dall'applicazione di un criterio di differenza statistica, ad esempio, $p \leq 0,05$. Si individuano i gruppi che presentano una significatività statistica. Occorre tuttavia evitare i pesi di «organi relativi», dato che le ipotesi statistiche che sottendono a tale manipolazione dei dati non sono valide.

▼M5

60. Per quanto concerne l'agonismo degli androgeni, il controllo è costituito dal gruppo sperimentale che riceve solo il mezzo disperdente. Le caratteristiche del modo di azione di una sostanza chimica possono provocare risposte relative diverse nei diversi tessuti, ad esempio il trenbolone, che non subisce l'azione della 5-alfa reduttasi, esercita effetti più pronunciati sul muscolo elevatore dell'ano, sul bulbocavernoso e sul glande rispetto al TP. Un aumento ponderale statisticamente significativo ($p \leq 0,05$) di due o più dei cinque tessuti bersaglio androgeno-dipendenti (prostata ventrale, muscolo elevatore dell'ano con bulbocavernoso, glande, ghiandole bulbouretrali e vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione) può essere considerato un risultato positivo relativamente all'azione agonista androgenica, nel qual caso tutti i tessuti bersaglio devono presentare una certa accelerazione della crescita. La valutazione combinata di tutte le risposte dei tessuti degli organi sessuali accessori può essere realizzata tramite un'idonea analisi multivariata dei dati. Questo metodo può servire per affinare l'analisi, in particolare nel caso in cui un solo tessuto fornisca una risposta statisticamente significativa.

61. Nello studio dell'antagonismo degli androgeni, il controllo è costituito dal gruppo cui è stato somministrato l'androgeno di riferimento (solo il testosterone propionato). Le caratteristiche del modo di azione di una sostanza chimica possono provocare risposte relative diverse nei diversi tessuti, ad esempio gli inibitori della 5-alfa reduttasi, come la finasteride, hanno effetti più marcati nella prostata ventrale che negli altri tessuti, rispetto a un potente antagonista di recettori per gli androgeni, come il flutamide. Una diminuzione ponderale statisticamente significativa ($p \leq 0,05$) di due o più dei cinque tessuti bersaglio androgeno-dipendenti (prostata ventrale, muscolo elevatore dell'ano con bulbocavernoso, glande, ghiandole bulbouretrali e vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione), rispetto al trattamento con solo TP, deve essere considerata un risultato positivo relativamente all'azione antagonista androgenica, nel qual caso tutti i tessuti bersaglio devono presentare un certo rallentamento della crescita. La valutazione combinata di tutte le risposte dei tessuti degli organi sessuali accessori può essere realizzata tramite un'idonea analisi multivariata dei dati. Questo metodo può servire per affinare l'analisi, in particolare nel caso in cui un solo tessuto fornisca una risposta statisticamente significativa.

62. I dati sono riassunti sotto forma di tabelle contenenti la media, l'errore standard della media (è ammessa anche la deviazione standard) e le dimensioni del campione per ciascun gruppo. Devono essere incluse anche tabelle con i dati individuali. Occorre esaminare i valori individuali, la media, l'errore standard (deviazione standard) e i valori del CV dei risultati del controllo per determinare se rispettano i criteri accettabili di coerenza con i valori storici previsti. Se i valori del CV sono superiori a quelli che figurano nella tabella 1 (cfr. paragrafi 25 e 26), occorre determinare, per ciascun peso di organo, se vi sono errori nella registrazione o nella trascrizione dei dati oppure se il laboratorio non è ancora in grado di condurre correttamente la dissezione dei tessuti androgeno-dipendenti e necessita di ulteriore formazione/pratica. Generalmente, i CV (deviazione standard divisa per il peso medio degli organi) sono riproducibili da un laboratorio all'altro e da uno studio all'altro. I dati presentati devono includere almeno il peso della prostata ventrale, della vescicola seminale, del muscolo elevatore dell'ano con il bulbocavernoso, delle ghiandole bulbouretrali, del glande, del fegato e il peso corporeo, nonché la variazione di quest'ultimo tra l'inizio della somministrazione fino all'autopsia. I dati possono anche essere presentati dopo una correzione di covarianza in funzione del peso corporeo, ma ciò non dispensa dal presentare i dati non corretti. Inoltre, se in qualche gruppo non si osserva la separazione prepuziale, occorre registrare l'incidenza di questo dato e confrontarla statisticamente con il gruppo di controllo utilizzando un test di Fisher esatto.

▼**M5**

63. Al momento di verificare la concordanza tra i risultati immessi nel computer e quelli sui fogli di lavoro originali, i valori ponderali degli organi che non sono biologicamente plausibili o che si scostano di oltre tre deviazioni standard rispetto a quelli del gruppo trattato vanno esaminati con molta attenzione ed eventualmente scartati, se si stabilisce che sono probabili errori di registrazione.

64. Il confronto dei risultati dello studio con i valori del CV dell'OCSE (tabella 1) è spesso una tappa importante dell'interpretazione, che serve a soppesare la validità dei risultati dello studio. Il laboratorio deve conservare i dati storici riguardanti i gruppi di controllo trattati con il mezzo disperdente, così come i dati storici sugli effetti delle sostanze chimiche di riferimento positive, come il TP e l'FT. Il laboratorio può inoltre saggiare periodicamente la risposta ad agonisti e antagonisti degli androgeni noti per la debole azione, e conservare i relativi dati. Questi dati possono essere confrontati con i dati OCSE disponibili per garantire che i metodi del laboratorio presentino una precisione e una potenza statistiche sufficienti.

▼**M5**

Appendice 1

DEFINIZIONI

Androgenico: indicante un influsso positivo sulla crescita dei tessuti androgeno-dipendenti.

Antiandrogenico: indicante la capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività del testosterone propionato nei mammiferi.

Data di nascita: giorno 0 dopo la nascita.

Dosaggio: termine generale che ricomprende la dose, la frequenza e la durata della somministrazione.

Dose: quantità di sostanza chimica somministrata. Nel saggio di Hershberger, la dose è espressa come peso della sostanza in esame per unità di peso corporeo dell'animale sperimentala per giorno (ad esempio, mg/kg peso corporeo/giorno).

Giorno postnatale X: giorno X di vita dopo il giorno di nascita.

Moribondo: termine utilizzato per descrivere un animale agonizzante, ossia prossimo alla morte.

Sensibilità: capacità di un metodo di prova di individuare correttamente le sostanze chimiche aventi la proprietà per la quale sono esaminate.

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

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

Specificità: capacità di un metodo di prova di individuare correttamente le sostanze chimiche non aventi la proprietà per la quale sono esaminate.

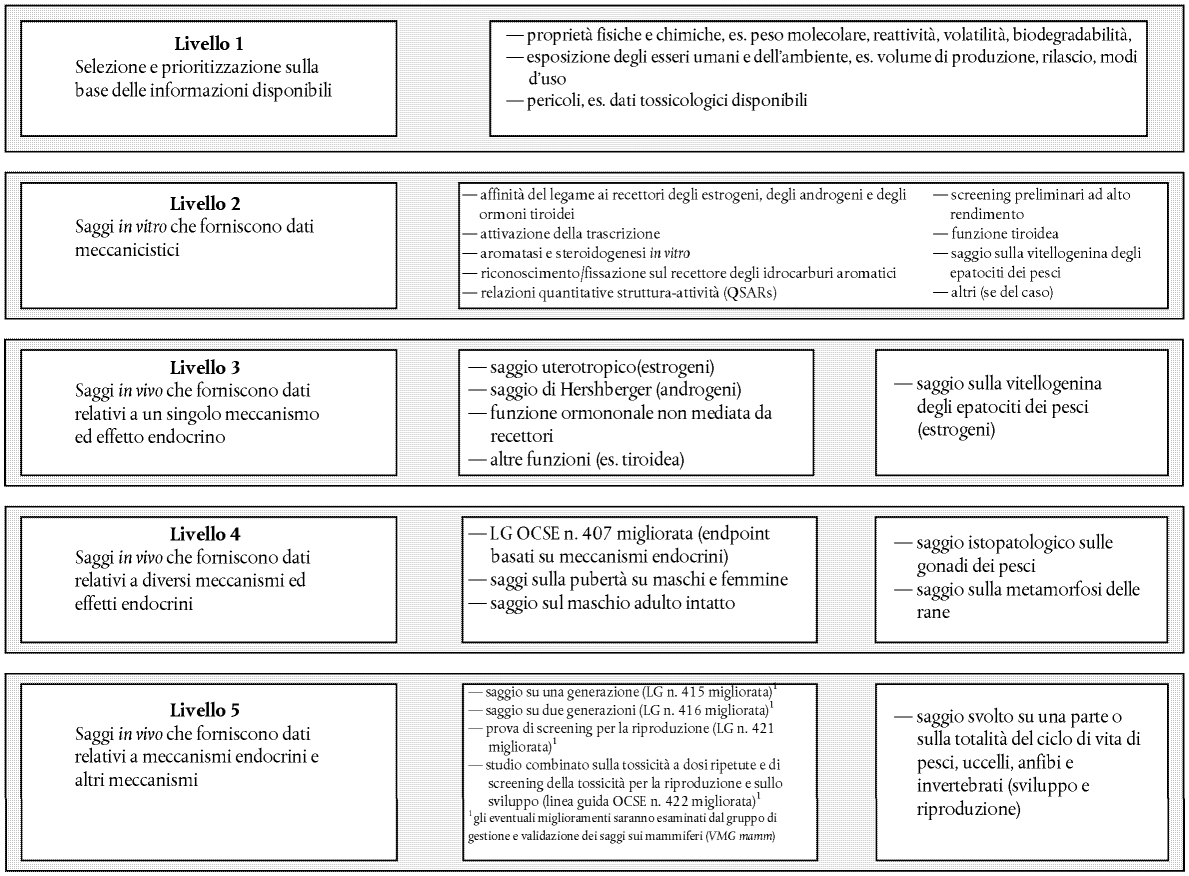
Validazione: processo scientifico destinato a caratterizzare i requisiti e i limiti operativi di un metodo di prova e a dimostrarne l'affidabilità e la pertinenza per un fine specifico.

▼M5

Appendice 2

Nota: documento preparato dal Segretariato del Programma sulle linee guida, a partire dall'accordo raggiunto alla VI riunione del gruppo di studio sulla sperimentazione e sulla valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino (*EDTA Task Force*)

Quadro concettuale dell'OCSE per la sperimentazione e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino



VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment (gruppo di gestione della validazione per la sperimentazione e la valutazione dei mammiferi)

▼**M5**

NOTE RELATIVE AL QUADRO CONCETTUALE

Nota 1: è possibile aderire al quadro e discostarsene a partire da qualsiasi livello, in base alla natura delle informazioni necessarie ai fini della valutazione dei rischi e dei pericoli.

Nota 2: nel livello 5, l'analisi ecotossicologica deve includere endpoint che mettano in evidenza i meccanismi degli effetti negativi, nonché i potenziali danni per la popolazione.

Nota 3: se un modello multimodale comprende diversi metodi di prova che forniscono dati su un solo endpoint, tale modello deve sostituire i singoli metodi.

Nota 4: ogni sostanza chimica deve essere valutata caso per caso, alla luce di tutte le informazioni disponibili e tenendo presente la funzione dei livelli del quadro.

Nota 5: la versione attuale del quadro non va considerata esaustiva. Tra le prove che figurano nei livelli 3, 4 e 5, alcune sono già disponibili, altre devono ancora essere convalidate e vi sono incluse provvisoriamente. Saranno confermate una volta messe a punto e convalidate.

Nota 6: il livello 5 non si limita a contenere solo metodi di prova definitivi. Le prove che vi figurano servono ai fini della valutazione generale dei rischi e dei pericoli.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (1998). Reports of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10^{th}-11^{th} March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.

(3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1-16.9.15. J Wiley and Sons Inc.

(4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 62. ENV/JM/MONO(2006)30.

(5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5a-Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 86. ENV/JM/MONO(2008)3.

(6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 73. ENV/JM/MONO(2007)20.

(7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269.

▼M5

(8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. Environ Health Perspect. 115(5):671-8.

(9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. Biochem J26:413-422.

(10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. Biochem J26:1306-1314.

(11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. J Pharmacol Exp Therap 99:38-44.

(12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for mytrophic activity. Endocrinology 45:113-119.

(13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. Proc Soc Exp Biol Med 83:175-180.

(14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.

(15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151-220.

(16) Massaro EJ (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, p 38.

(17) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(18) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

(19) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

(20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269. Cfr. section II, The dissection guidance provided to the laboratories: http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf

(22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html

(23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.

(24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.

(25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.

▼**M5**

(26) 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).

(27) I seguenti capitoli del presente allegato:

B.1 *bis*, Tossicità acuta orale — Metodo a dose fissa

B.1 *ter*, Tossicità acuta per via orale — Metodo della classe di tossicità acuta

▼M5

B.56. **STUDIO ESTESO DELLA TOSSICITÀ PER LA RIPRODUZIONE SU UNA GENERAZIONE**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼**M5**

B.57. **SAGGIO DI STEROIDOGENESI SU H295R**

▼**M10**

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼M5

B.58. **SAGGI DI MUTAGENESI DI CELLULE SOMATICHE E GERMINALI DI RODITORI TRANSGENICI**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼M7

B.59. **SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA *IN CHEMICO*: SAGGIO DI REATTIVITÀ PEPTIDICA DIRETTA (DPRA)**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼M7

B.60. **SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA IN VITRO: METODO DI PROVA DELLA LUCIFERASI ARE-NRF2**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼M7

B.61. **METODO DI PROVA DI DIFFUSIONE DELLA FLUORESCEINA PER L'INDIVIDUAZIONE DI SOSTANZE CORROSIVE E GRAVEMENTE IRRITANTI PER GLI OCCHI**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼M7

B.62. TEST DELLA COMETA *IN VIVO* IN CONDIZIONI ALCALINE SU CELLULE DI MAMMIFERI

INTRODUZIONE

Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 489 (2016). Il test della cometa in vivo in condizioni alcaline su cellule di mammiferi (elettroforesi su gel a singola cellula — *single cell gel electrophoresis*), nel prosieguo semplicemente il «test della cometa», è utilizzato per individuare le rotture di filamenti del DNA in cellule o nuclei isolati a partire da tessuti multipli di animali, in genere roditori, esposti a materiali potenzialmente genotossici. Il test della cometa è stato esaminato e diversi gruppi di esperti hanno pubblicato raccomandazioni in materia (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). Il presente metodo di prova è parte integrante di una serie di metodi di prova sulla tossicologia genetica. È stato elaborato un documento OCSE contenente informazioni succinte sulle prove di tossicologia genetica e un compendio delle modifiche recentemente apportate alla rispettiva linea guida (11).

Il test della cometa ha l'obiettivo di individuare le sostanze chimiche che provocano lesioni al DNA. In condizioni alcaline (> pH 13), il test della cometa può individuare rotture singole e doppie di filamenti provocate, ad esempio, da interazioni dirette con il DNA, siti alcali-labili o riconducibili a rotture provvisorie del DNA derivanti da una riparazione del DNA per escissione. Le rotture dei filamenti del DNA possono essere riparate, e avere quindi effetti non persistenti, possono essere letali per la cellula o possono essere riparate dando vita a una mutazione permanente funzionale. Possono inoltre provocare lesioni cromosomiche del tipo di quelle associate a molte malattie dell'uomo, quali il cancro.

Uno studio formale di validazione del test della cometa in vitro su roditori è stato effettuato nel periodo 2006-2012 con il coordinamento del Centro giapponese per la convalida dei metodi alternativi (JaCVAM) in collegamento con il Centro europeo per la convalida di metodi alternativi (ECVAM), il Comitato di coordinamento inter-agenzia per la convalida dei metodi alternativi (ICCVAM) e il Centro inter-agenzia per la valutazione di metodi tossicologici alternativi del NTP (NICEATM) (12). Il presente metodo di prova indica l'uso e i limiti raccomandati del test della cometa e si basa sul protocollo finale (12) utilizzato nella prova di convalida e su pertinenti dati complementari pubblicati e non pubblicati (dati di proprietà dei laboratori).

Le definizioni dei termini fondamentali figurano nell'appendice 1. Va rilevato che per l'esecuzione del presente test possono essere utilizzate molte piattaforme diverse (vetrini per microscopio, gocce di gel, piastre a 96 pozzetti, ecc.). Per motivi di praticità in tutto il presente documento viene utilizzato il termine «vetrini» ma esso è riferito anche a tutti gli altri supporti.

CONSIDERAZIONI PRELIMINARI E LIMITI

Il test della cometa è un metodo per misurare le rotture di filamenti del DNA nelle cellule eucariote. Singole cellule/nuclei in una sospensione in gel di agarosio collocata sui vetrini sono sottoposte a lisi con un detergente e concentrazioni elevate di sale. La lisi permette di digerire le membrane cellulari e nucleari e consente il rilascio di anse di DNA a spirale, chiamate generalmente nucleotidi, e frammenti di DNA. L'elettroforesi a pH elevato produce strutture che assomigliano a comete e che, utilizzando adeguati coloranti fluorescenti, possono essere esaminate con un microscopio a fluorescenza; i frammenti di DNA migrano dalla testa verso la coda della cometa in base alla loro dimensione e l'intensità della coda della cometa in rapporto all'intensità totale (testa più coda) riflette la portata della rottura del DNA (13) (14) (15).

Il test della cometa in vivo in condizioni alcaline è particolarmente indicato per valutare il rischio genotossico, in quanto le risposte al test dipendono dall'ADME in vivo (assorbimento, distribuzione, metabolismo e eliminazione) e anche dai processi di riparazione del DNA. Questi ultimi possono variare a seconda delle specie, dei tessuti e dei tipi di lesioni del DNA.

▼M7

Al fine di rispettare i requisiti in materia di benessere degli animali e, in particolare, la riduzione del loro impiego mediante la sostituzione, la riduzione e il perfezionamento degli esperimenti su animali (in inglese il principio delle tre R — *Replacement, Reduction, Refinement*), il presente test può essere integrato con altri studi tossicologici (10) (16) (17) oppure l'endpoint può essere combinato con altri endpoint della genotossicità, quali il test micronucleare di eritrocita di mammifero (18) (19) (20). Il test della cometa è generalmente praticato sui roditori, anche se è stato utilizzato con altre specie di mammiferi e non mammiferi. L'uso di specie diverse dai roditori deve essere giustificato caso per caso sul piano etico e scientifico e comunque si raccomanda vivamente di eseguire il test della cometa su specie diverse dai roditori soltanto nell'ambito di un altro studio sulla tossicità e non come test isolato.

La selezione della via di esposizione e del o dei tessuti da sottoporre a prova va determinata sulla base di tutte le conoscenze esistenti/disponibili delle sostanze chimiche in esame, ad esempio la via di esposizione umana intesa/attesa, il metabolismo e la distribuzione, i potenziali effetti per il punto di contatto, le allerte strutturali, altri dati sulla tossicità o genotossicità e l'obiettivo dello studio. In questo modo, se del caso, il potenziale genotossico delle sostanze chimiche in esame può essere sottoposto a prova nel o nei tessuti interessati dagli effetti cancerogeni e/o da altri effetti tossici. Il test può essere considerato utile inoltre per esaminare ulteriormente la genotossicità rilevata da un sistema in vitro. È opportuno effettuare un test della cometa in vivo su un tessuto di interesse, se ci si può ragionevolmente attendere che tale tessuto sarà adeguatamente esposto.

I test di validazione più completi sull'uso del test della cometa hanno riguardato i tessuti somatici dei ratti maschi e sono stati effettuati in studi interlaboratorio, quali il test del JaCVAM (12) e in Rothfuss *et al*., 2010 (10). Nello studio internazionale di convalida del JaCVAM sono stati utilizzati lo stomaco e il fegato. Il fegato, perché è l'organo maggiormente attivo nel metabolismo delle sostanze chimiche e perché è sovente bersaglio di cancerogenicità. Lo stomaco perché è di solito il primo punto di contatto delle sostanze chimiche dopo l'esposizione per via orale, per quanto anche altre aree del tratto gastrointestinale, quali il duodeno e il digiuno, vadano considerate tessuti di contatto e siano forse più pertinenti per l'uomo di quanto sia lo stomaco ghiandolare dei roditori. Ci si deve assicurare che tali tessuti non siano esposti a quantitativi eccessivamente elevati della sostanza chimica in esame (21). La tecnica di cui trattasi è in linea di principio applicabile a qualsiasi tessuto dal quale possano essere ricavate sospensioni analizzabili di singole cellule/nuclei. I dati in possesso di molti laboratori dimostrano che il test può essere applicato con successo a molti tessuti differenti e numerose pubblicazioni indicano l'applicabilità della tecnica a organi o tessuti diversi dal fegato e dallo stomaco, ad esempio l'intestino digiuno (22), i reni (23) (24), la pelle (25) (26), o le cellule provenienti dalla vescica (27) (28) e dal lavaggio polmonare o broncoalveolare (pertinente per lo studio delle sostanze chimiche inalate) (29) (30); sono stati realizzati inoltre test su organi multipli (31) (32).

Se, da un lato, può essere interessante per studiare gli effetti genotossici nelle cellule germinali, va tuttavia sottolineato, dall'altro, che il presente metodo di prova non è considerato appropriato per misurare le rotture dei filamenti del DNA in cellule germinali mature. Poiché, in materia di lesioni del DNA, la letteratura relativa all'uso del test della cometa per determinare la genotossicità sulle cellule germinali ha evidenziato livelli di fondo elevati e variabili (33), si ritiene necessario modificare il protocollo e migliorare gli studi di standardizzazione e convalida prima di includere nel metodo di prova il test della cometa sulle cellule germinali (ad esempio, quelle dello sperma). Inoltre, il regime di esposizione raccomandato, descritto nel presente metodo di prova, non è ottimale e, per un'applicazione all'analisi delle rotture del filamento di DNA nelle cellule mature dello sperma, sarebbero necessari tempi di esposizione o di campionamento più lunghi. Gli effetti genotossici misurati dal test della cometa nelle cellule dei testicoli a differenti stadi di differenziazione sono illustrati in letteratura (34) (35). Va tuttavia rilevato che le gonadi contengono un misto di cellule somatiche e germinali. Per questo motivo risultati positivi sull'insieme delle gonadi (testicoli) non indicano necessariamente danni alle cellule germinali; essi indicano tuttavia che la o le sostanze in esame e/o i loro metaboliti hanno raggiunto le gonadi.

▼M7

Le condizioni sperimentali standard del test della cometa non permettono di individuare in modo affidabile i legami crociati. In alcune condizioni sperimentali potrebbero essere individuati i legami crociati DNA-DNA e DNA-proteina come pure altre modificazioni di base, quali le basi ossidate (23) (36) (37) (38) (39). Ma ulteriori ricerche sono necessarie per caratterizzare in modo adeguato le necessarie modifiche del protocollo. Pertanto, l'individuazione degli agenti responsabili dei legami crociati non è l'obiettivo principale del test qui descritto. Il test non è appropriato, neanche in versione modificata, per l'individuazione degli aneugeni.

Allo stato attuale delle conoscenze, il test della cometa in vivo presenta diversi altri limiti (cfr. appendice 3). Ci si aspetta che in futuro il metodo di prova sarà esaminato e, se necessario, modificato alla luce dell'esperienza acquisita.

Prima di applicare il presente metodo di prova a una miscela per generare dati ai fini regolamentari previsti, si deve considerare se, e in caso affermativo, perché, esso possa fornire risultati adeguati a tale scopo. Tale verifica non è necessaria se la miscela viene sottoposta a prova in ottemperanza a un obbligo regolamentare.

PRINCIPIO DEL METODO

Gli animali sono esposti alla sostanza chimica in esame tramite una via adeguata. Ai punti 36-40 viene fornita una descrizione dettagliata di dosaggio e campionamento. Nei momenti scelti per il campionamento i tessuti di interesse sono sezionati e vengono preparate sospensioni di singole cellule/nuclei (se considerato utile, ad esempio per il fegato, può essere realizzata una perfusione *in situ*) in un gel di agarosio per fissarle sui vetrini. Le cellule/nuclei sono trattate con un tampone di lisi per rimuovere la membrana cellulare e/o nucleare e sono esposte a una base forte (ad esempio, pH ≥13) per consentire lo svolgimento del DNA e il rilascio delle anse e frammenti di DNA «rilassato». Il DNA nucleare nell'agarosio è quindi sottoposto a elettroforesi. Le molecole normali, non frammentate, di DNA restano nella posizione in cui si trovava il DNA nucleare nell'agarosio, mentre il DNA frammentato e le anse di DNA rilassato si spostano verso l'anodo. Dopo l'elettroforesi il DNA è visualizzato utilizzando un adeguato colorante fluorescente. Le preparazioni sono analizzate utilizzando un microscopio e sistemi di analisi dell'immagine parzialmente o totalmente automatizzati. La portata della migrazione del DNA durante l'elettroforesi e la distanza di tale migrazione danno conto del numero e delle dimensioni dei frammenti di DNA. Il test della cometa presenta diversi endpoint. Per valutare le lesioni al DNA si raccomanda di prendere in considerazione il contenuto di DNA nella coda o l'intensità della coda (*% tail DNA or % tail intensity*) (12) (40) (41) (42). Dopo l'analisi di un sufficiente numero di nuclei, i dati sono interpretati utilizzando metodi di analisi appropriati.

Va sottolineato che le modifiche apportate a diversi aspetti della metodologia, inclusa la preparazione dei campioni, le condizioni dell'elettroforesi, i parametri dell'analisi visiva (ad esempio, intensità del colorante, intensità luminosa della lampada del microscopio e l'utilizzo di filtri del microscopio e i parametri dinamici della fotocamera), nonché le condizioni ambiente (ad esempio, illuminazione ambiente) sono state oggetto di indagine e potrebbero influenzare la migrazione del DNA (43) (44) (45) (46).

VERIFICA DELLA COMPETENZA DEL LABORATORIO

Ciascun laboratorio deve provare la propria competenza sperimentale a effettuare il test della cometa, dimostrando la capacità di ottenere sospensioni di singole cellule o nuclei in quantità sufficienti per tutti i tessuti in esame per ciascuna specie utilizzata. La qualità delle preparazioni viene analizzata innanzitutto sulla base della percentuale di DNA nella coda per gli animali trattati con il mezzo disperdente che si collocano in una gamma bassa riproducibile. I dati attuali suggeriscono che la percentuale media di DNA di coda del gruppo (basata sulla media delle mediane — cfr. punto 57 per dettagli su questi termini) nel fegato dei ratti non dovrebbe, di preferenza, superare il 6 %, dato che sarebbe conforme ai valori dello studio di convalida del JaCVAM (12) e di altri dati pubblicati o privati. Al momento non si dispone di dati sufficienti per formulare raccomandazioni relativamente alle gamme ottimali o accettabili per altri tessuti. Ciò non

▼M7

preclude tuttavia l'uso di altri tessuti, se giustificato. La relazione sulla prova deve illustrare in modo appropriato l'esecuzione del test della cometa su tali tessuti in relazione alla letteratura pubblicata o a dati privati. In primo luogo, una percentuale bassa di DNA di coda nei controlli è auspicabile per disporre di un intervallo dinamico sufficiente al fine di individuare un effetto positivo. In secondo luogo, ciascun laboratorio deve essere in grado di riprodurre le risposte attese per i mutageni diretti e promutageni, con differenti modalità di azione, come indicato nella tabella 1 (punto 29).

Sostanze positive possono essere selezionate, ad esempio, dallo studio di convalida del JaCVAM (12) o da altri dati pubblicati (cfr. punto 9), se del caso, giustificando tale scelta e dimostrando l'esistenza di risposte positive chiare nei tessuti di interesse. Deve essere inoltre dimostrata la capacità di individuare gli effetti deboli di mutageni conosciuti, quali l'EMS a basso dosaggio, stabilendo, a titolo di esempio, relazioni dose-risposta con adeguati numeri di dosi e intervalli tra le dosi. In un primo tempo le operazioni devono cercare di stabilire competenze nel trattamento dei tessuti di uso più comune, ad esempio il fegato dei roditori, per i quali è possibile operare confronti con i dati esistenti e i risultati attesi (12). Allo stesso tempo possono essere raccolti dati relativi ad altri tessuti, ad esempio stomaco/duodeno/digiuno, sangue ecc. Il laboratorio deve evidenziare la propria competenza per ciascun tessuto di ciascuna specie che prevede di studiare e dimostrare che in tale tessuto può essere ottenuta una risposta positiva accettabile con un mutageno conosciuto (ad esempio, EMS).

È necessario raccogliere i dati relativi al mezzo disperdente/controllo negativo per dimostrare la riproducibilità delle risposte negative e accertarsi che gli aspetti tecnici del test siano stati adeguatamente verificati o per suggerire la necessità di ristabilire gli intervalli di controllo storici (cfr. punto 22).

Va sottolineato che, se da un lato è possibile raccogliere tessuti multipli in fase di necroscopia e trattarli per il test della cometa, il laboratorio, dall'altro, deve essere in grado di raccogliere differenti tessuti da un singolo animale, assicurandosi così che non vada trascurata nessuna lesione potenziale del DNA e che il test della cometa non sia compromesso. L'intervallo di tempo tra la soppressione dell'animale e la rimozione dei tessuti può essere critico (cfr. punto 44).

Nel mettere a punto le competenze nei diversi aspetti del test in questione si deve tenere conto del benessere degli animali; a tal fine è quindi possibile utilizzare tessuti provenienti da animali utilizzati in altri test. Inoltre, può non essere necessario effettuare uno studio completo nelle fasi di definizione di un nuovo metodo di prova in laboratorio e al fine di sviluppare le necessarie abilità si possono utilizzare meno animali e concentrazioni di prova.

Dati storici di controllo

In sede di verifica delle competenze il laboratorio deve creare una banca di dati storici per stabilire gli intervalli e le distribuzioni dei controlli positivi e negativi per i tessuti e le specie oggetto di indagine. In letteratura (47) figurano raccomandazioni sulle modalità di raccolta e uso dei dati storici (ad esempio, i criteri di inclusione o esclusione di dati nei dati storici e i criteri di accettabilità di un dato esperimento). Differenti tessuti e differenti specie, come pure differenti mezzi disperdenti e vie di somministrazione, possono determinare percentuali di DNA di coda differenti per i controlli negativi. È pertanto importante stabilire intervalli dei controlli negativi per ciascun tessuto e specie. I laboratori devono

▼M7

utilizzare metodi di controllo della qualità, quali carte di controllo (ad esempio, carte C o X medio (48)) per evidenziare la variabilità dei loro dati e dimostrare che la metodologia è «sotto controllo». Può essere inoltre necessario ottimizzare la selezione delle sostanze appropriate per i controlli positivi, gli intervalli delle dosi e le condizioni sperimentali (ad esempio, le condizioni dell'elettroforesi) per individuare gli effetti deboli (cfr. punto 17).

Eventuali modifiche del protocollo sperimentale devono essere valutate in base alla coerenza con le banche dati storiche in relazione ai controlli. Eventuali notevoli incoerenze devono tradursi nella creazione di una nuova banca dati storica sui controlli.

DESCRIZIONE DEL METODO

Preparazioni

Selezione delle specie animali

Gli animali utilizzati sono di norma adulti giovani e sani (di età compresa tra 6 e 10 settimane all'inizio del trattamento, benché siano accettabili anche animali di età leggermente superiore) appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. La scelta delle specie di roditori deve basarsi i) sulle specie utilizzate in altri studi di tossicità (per poter effettuare la correlazione tra i dati e consentire l'integrazione degli studi), ii) sulle specie che hanno sviluppato tumori in uno studio sulla cancerogenicità (quando si studia il meccanismo della cancerogenesi) oppure iii) sulle specie che presentano il metabolismo più simile a quello dell'uomo, se note. Per il presente test si usano di norma roditori. Possono essere tuttavia utilizzate altre specie, qualora ciò sia eticamente e scientificamente giustificato.

Condizioni di stabulazione e alimentazione degli animali

Per i roditori la temperatura dello stabulario deve essere idealmente di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve essere idealmente del 50-60 %, non inferiore al 30 % e, preferibilmente, non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 di oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua da bere. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di garantire un'adeguata miscela della sostanza in esame, se somministrata con questo metodo. I roditori vanno stabulati in piccoli gruppi (di solito non più di cinque) dello stesso sesso se non si prevede alcun comportamento aggressivo. Gli animali possono essere stabulati individualmente soltanto se ciò è giustificato dal punto di vista scientifico. Laddove possibile, il fondo delle gabbie deve essere compatto in quanto fondi grigliati possono provocare ferite gravi (49). È necessario fornire un adeguato arricchimento ambientale.

Preparazione degli animali

L'assegnazione degli animali ai gruppi di controllo e di trattamento avviene mediante randomizzazione. Gli animali sono identificati individualmente e acclimatati alle condizioni del laboratorio per almeno cinque giorni prima dell'inizio del trattamento. Per identificare individualmente gli animali deve essere usato il metodo meno invasivo possibile. Tra i metodi appropriati figurano l'apposizione di anelli, di etichette, di microchip e l'identificazione biometrica. L'apposizione di graffette metalliche sulle orecchie o sulle zampe non è scientificamente giustificata in queste prove. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. All'inizio dello studio le variazioni di peso tra gli animali devono essere minime e non superare ± 20 %.

Preparazione delle dosi

Le sostanze solide in esame vanno sciolte o poste in sospensione in appropriati mezzi disperdenti o mescolate alla dieta o all'acqua da bere prima di essere somministrate agli animali. Le sostanze liquide possono essere somministrate direttamente o diluite prima del trattamento. In caso di esposizione per via inalatoria, le sostanze possono essere somministrate sotto forma di gas, vapore o aerosol solido o liquido, in funzione delle loro proprietà fisico-chimiche (50) (51).

Le preparazioni della sostanza chimica in esame devono essere predisposte sul momento a meno di non disporre di dati che dimostrino la stabilità delle preparazioni in condizioni di stoccaggio e permettano di definire tali condizioni in modo adeguato.

▼M7

Condizioni di prova

Mezzo disperdente

Il mezzo disperdente non deve produrre effetti tossici alle dosi usate e non deve reagire chimicamente con le sostanze chimiche in esame. L'uso di mezzi disperdenti poco noti è ammesso solo se suffragato da dati che ne provino la compatibilità per quanto riguarda gli animali utilizzati nella prova, la via si somministrazione e l'endpoint. Se possibile si raccomanda di considerare in primo luogo l'uso di un solvente/mezzo disperdente acquoso. Si deve tenere presente che alcuni mezzi disperdenti (in particolare quelli viscosi) possono provocare infiammazioni e aumentare il livello di fondo delle rotture di filamenti di DNA nel punto di contatto, soprattutto in caso di somministrazioni multiple.

Controlli

Controlli positivi

Attualmente, per ciascuna prova viene di norma utilizzato un gruppo comprendente un minimo di 3 animali analizzabili dello stesso sesso, o dei due sessi se sono utilizzati entrambi (cfr. punto 32), trattato con una sostanza utilizzata come controllo positivo. In futuro i laboratori potranno forse dimostrare che competenze tali da consentire loro di ridurre il numero dei controlli positivi. Qualora siano usati tempi di campionamento multipli (ad esempio, nel caso di un protocollo che prevede un'unica somministrazione), è sufficiente prevedere controlli positivi solo per un campionamento, garantendo al contempo una ripartizione equilibrata (cfr. punto 48). Non è necessario somministrare le sostanze chimiche utilizzate come controllo positivo per la stessa via della sostanza chimica in esame; è importante invece utilizzare la stessa via di somministrazione per misurare gli effetti sul punto di contatto. È necessario dimostrare che le sostanze utilizzate come controllo positivo provocano rotture dei filamenti di DNA in tutti i tessuti di interesse per la sostanza chimica in esame; l'EMS costituisce probabilmente la scelta più logica di controllo positivo in quanto ha prodotto rotture dei filamenti di DNA in tutti i tessuti oggetto di studio. Le dosi delle sostanze chimiche utilizzate come controllo positivo devono essere scelte in modo da produrre effetti moderati che consentano una valutazione dell'efficacia e della sensibilità della prova e possono basarsi sulle curve dose-risposta stabilite dal laboratorio nella fase di dimostrazione delle proprie competenze. La percentuale di DNA di coda nei controlli positivi simultanei deve essere coerente con gli intervalli prestabiliti in laboratorio per ciascun tessuto e tempi di campionamento per la specie considerata (cfr. punto 16). Esempi di sostanze usate per i controlli positivi e di alcuni loro tessuti bersaglio (nei roditori) figurano nella tabella 1. Sostanze diverse da quelle riportate nella tabella 1 possono essere selezionate, se ciò è scientificamente giustificato.

Tabella 1

Esempi di sostanze usate come controlli positivi e di alcuni loro tessuti bersaglio

Sostanze e n. CAS
Metansolfonato di etile (n. CAS 62-50-0), per tutti i tessuti
Etilnitrosourea (n. CAS 759-73-9), per il fegato e lo stomaco, il duodeno o il digiuno
Metansolfonato di metile (n. CAS 66-27-3), per il fegato, lo stomaco, il duodeno o il digiuno, le cellule provenienti dal lavaggio polmonare o broncoalveolare, reni, vescica, polmoni, testicoli e midollo osseo/sangue
N-Metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (n. CAS: 70-25-7), per lo stomaco, il duodeno o il digiuno
1,2-dimetilidrazina 2HCl (n. CAS 306-37-6), per il fegato e l'intestino
N-metil-*N*-nitrosourea (n. CAS 684-93-5), per il fegato, il midollo osseo, sangue, reni, stomaco, digiuno e cervello

▼M7

Controlli negativi

In ciascuna prova e per ciascun momento di campionamento deve essere incluso un gruppo di animali di controllo negativo, cui viene somministrato il solo mezzo disperdente e che sono altrimenti trattati nello stesso modo dei gruppi di trattamento. La percentuale di DNA di coda negli animali del controllo negativo deve rientrare negli intervalli di fondo prestabiliti in laboratorio per ciascun tessuto e momenti di campionamento per la specie considerata (cfr. punto 16). In assenza di dati storici o pubblicati relativi ai controlli, indicanti che il mezzo disperdente scelto, il numero di somministrazioni o la via di somministrazione non inducono effetti deleteri o genotossici, è necessario effettuare studi preliminari prima di avviare lo studio completo al fine di stabilire l'accettabilità del mezzo disperdente da utilizzare per i controlli.

PROCEDURA

Numero e sesso degli animali

Benché vi siano pochi dati su animali di sesso femminile sulla cui base effettuare confronti tra i sessi nel caso del test della cometa, in generale le risposte ai test di genotossicità in vivo sono simili tra gli animali di sesso maschile e femminile e, pertanto, la maggior parte degli studi può essere realizzata con animali dell'uno o dell'altro sesso. I dati che evidenziano differenze significative tra maschi e femmine (ad esempio, differenze sul piano della tossicità sistemica, del metabolismo, della biodisponibilità, ecc., comprendenti, ad esempio, dati provenienti da uno studio per determinare l'intervallo di dosi) incoraggiano a utilizzare entrambi i sessi. In questo caso può essere opportuno realizzare uno studio su entrambi i sessi, ad esempio nell'ambito di uno studio di tossicità a dosi ripetute. In caso di uso di entrambi i sessi può essere opportuno ricorrere a un modello fattoriale. Nell'appendice 2 sono riportate informazioni sulle modalità di analisi dei dati in caso di utilizzo di tale modello.

Le dimensioni del gruppo all'inizio dello studio (e in fase di dimostrazione delle competenze) devono essere tali da permettere di disporre di almeno 5 animali analizzabili dello stesso sesso, o di ciascun sesso in caso di utilizzo di entrambi i sessi, per gruppo (e di un numero inferiore nel concomitante gruppo di controllo positivo — cfr punto 29). Se l'esposizione umana a sostanze chimiche è specifica per un sesso, ad esempio nel caso di alcuni prodotti farmaceutici, il test deve essere eseguito su animali di tale sesso. In relazione al numero massimo di animali generalmente richiesto, a titolo informativo uno studio realizzato sulla base dei parametri di cui al punto 33 con tre gruppi di trattamento, e relativi gruppi di controllo positivo e negativo (ognuno composto da cinque animali dello stesso sesso) richiede tra 25 e 35 animali.

CALENDARIO DI TRATTAMENTO

Gli animali devono ricevere un trattamento quotidiano per un periodo di due giorni o più (ovvero due o più trattamenti a intervalli di circa 24 l'uno dall'altro) e i campioni devono essere raccolti una volta entro 2-6 ore (o a T_{max}) dopo l'ultimo trattamento (12). Possono essere accettati anche campioni provenienti da regimi di trattamento prolungato (ad esempio, dosi quotidiane per 28 giorni). È stato dimostrato che il test della cometa e il test micronucleare di eritrocita possono essere combinati con successo (10) (19). Tuttavia, grande attenzione deve essere dedicata agli aspetti logistici che comporta il prelievo di campioni di tessuti per il test della cometa, rispettando al contempo i requisiti relativi al campionamento di tessuti per altri tipi di valutazioni tossicologiche. Il prelievo 24 ore dopo l'ultima dose, tipico di uno studio generale sulla tossicità, non è appropriato nella maggior parte dei casi (cfr punto 40 sui momenti di campionamento). L'utilizzo di altri calendari di trattamento e di campionamento deve essere giustificato (cfr. appendice 3). Ad esempio, è possibile utilizzare un unico trattamento con campionamento multiplo, sapendo tuttavia che per uno studio che preveda una sola somministrazione è necessario un numero maggiore di animali dato il numero di momenti di campionamento necessari; in alcuni casi tale soluzione può essere preferibile, ad esempio quando la sostanza chimica in esame provoca una tossicità eccessiva a seguito di ripetute somministrazioni.

▼M7

Qualunque modalità di esecuzione del test è tuttavia accettabile, a condizione che la sostanza chimica in esame dia una risposta positiva o, in caso di risposta negativa, a condizione che si ottenga una risposta diretta o indiretta dell'esposizione del o dei tessuti bersaglio o della tossicità per tali tessuti o qualora venga raggiunta la dose limite (cfr. punto 36).

Per agevolare la somministrazione di un grande volume di sostanze chimiche in esame, quest'ultime possono essere somministrate anche in dosi frazionate, ad esempio in due volte nello stesso giorno, a distanza di 2-3 ore al massimo. In questo caso il campionamento viene fissato in relazione al momento della somministrazione dell'ultima dose (cfr. punto 40).

Livelli di dose

Qualora venga effettuato uno studio preliminare per determinare l'intervallo di dosi, in quanto non sono disponibili dati adeguati da studi pertinenti che forniscano un orientamento in tal senso, tale studio deve essere effettuato nello stesso laboratorio, utilizzando specie, ceppi, sesso e regime di trattamento identici a quelli da utilizzare nello studio principale sulla base delle metodologie attualmente in uso per gli studi sugli intervalli di concentrazione delle dosi. Lo studio deve essere finalizzato a individuare la dose massima tollerata (DMT), definita come la dose che provoca lievi effetti tossici in relazione alla durata dello studio (ad esempio, segnali clinici chiari, quali reazioni o comportamenti anormali, perdita di peso moderata o citotossicità del tessuto interessato), ma che non provoca la morte dell'animale o segni di dolore e sofferenza tali da renderne necessaria la soppressione. Per una sostanza chimica in esame non tossica, con un periodo di somministrazione pari o superiore a 14 giorni, la dose massima (limite) è di 1 000 mg/kg per peso corporeo/giorno. Per periodi di somministrazione inferiori a 14 giorni, la dose massima (limite) è di 2 000 mg/kg per peso corporeo/giorno. Nel caso di talune sostanze chimiche di prova (ad esempio, prodotti farmaceutici per uso umano), oggetto di regolamentazioni specifiche, questi limiti possono subire variazioni.

Le sostanze chimiche che evidenziano saturazione delle caratteristiche tossicocinetiche, o che inducono processi di detossificazione che si traducono in una diminuzione dell'esposizione dopo una somministrazione di lungo termine, possono essere considerate eccezioni rispetto ai criteri di definizione della dose e vanno valutate caso per caso.

Nel caso delle versioni acuta e subacuta del test della cometa, oltre alla dose massima (DMT, dose massima possibile, esposizione massima o dose limite), al fine di dimostrare le risposte relative alla dose si deve selezionare, per ciascun momento di campionamento, una serie supplementare di almeno due dosi decrescenti che presentino un intervallo adeguato (di preferenza inferiore a 10). Tuttavia, i livelli di dose utilizzati devono anche, di preferenza, coprire un intervallo che va dalla dose massima alla dose che produce un effetto tossico limitato o nessun effetto tossico. Quando, per tutti i livelli di dose oggetto di studio, viene rilevata tossicità del tessuto bersaglio, è consigliabile effettuare ulteriori studi con dosi non tossiche (cfr. punti 54-55). Gli studi che intendano approfondire l'andamento della curva dose-risposta possono dover ricorrere a uno o più gruppi di trattamento supplementari.

Somministrazione delle dosi

Nella concezione di una prova va considerata la via d'esposizione umana prevista. Pertanto, vie di somministrazione quali alimentazione, acqua da bere, inalazione, impianto, vie topiche, sottocutanee, endovenose, via orale (mediante sonda gastrica) o intratracheale possono essere utilizzate nella misura in cui sono giustificate. In ogni caso, si deve optare per la via che garantisce un'adeguata esposizione del o dei tessuti bersaglio. Le iniezioni intraperitoneali non sono in genere raccomandate in quanto non costituiscono una via di esposizione rappresentativa di quella umana e devono essere usate soltanto in presenza di una giustificazione precisa (ad esempio, nel caso di talune sostanze utilizzate per il controllo positivo o di farmaci somministrati per via intraperitoneale). Il volume massimo di liquido somministrabile in una sola volta con sonda gastrica o con

▼M7

iniezione dipende dalle dimensioni dell'animale da laboratorio. Il volume non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo, tranne nel caso delle soluzioni acquose che possono essere somministrate in quantità pari a 2 ml/100 g di peso corporeo. L'uso di volumi maggiori (se consentito dalla legislazione in materia di benessere degli animali) deve essere giustificato. Laddove possibile, i differenti livelli delle dosi devono essere ottenuti adeguando la concentrazione della formulazione somministrata per garantire, a tutti i livelli di dose, un volume costante in relazione al peso corporeo.

Momento di campionamento

Il momento di campionamento è una variabile fondamentale in quanto dipende dal tempo necessario affinché le sostanze chimiche in esame raggiungano la concentrazione massima nel tessuto bersaglio e provochino la rottura del filamento del DNA, ma prima che tali rotture siano rimosse, riparate o provochino la morte della cellula. La durata di determinate lesioni che provocano la rottura di filamenti del DNA, individuate dal test della cometa, può essere molto breve, almeno per alcune sostanze chimiche testate in vitro (52) (53). Ne consegue che, se si sospetta la presenza di tali lesioni transitorie del DNA, è necessario adottare misure per limitarne la sparizione, assicurandosi che i tessuti siano prelevati precocemente, eventualmente prima dei tempi standard riportati di seguito. I periodi di campionamento ottimali possono dipendere dalla sostanza chimica o dalla via di somministrazione, traducendosi, ad esempio, in una rapida esposizione del tessuto in caso di somministrazione per endovena o inalazione. Di conseguenza, i periodi di campionamento sono determinati in funzione dei dati cinetici, se disponibili (ad esempio, tempo (T_{max}) in cui si raggiunge la concentrazione massima (C_{max}) nel plasma o tessuto o allo stato stazionario nel caso di somministrazioni multiple). In assenza di dati cinetici un compromesso accettabile per misurare la genotossicità è quello di effettuare il campionamento 2-6 ore dopo l'ultimo trattamento nel caso di due o più trattamenti o dopo 2-6 ore e 16-26 ore nel caso di una singola somministrazione, avendo cura di effettuare la necropsia di tutti gli animali contemporaneamente dopo l'ultima (o la sola) dose. Per selezionare i momenti di campionamento adeguati possono essere utilizzate, se disponibili, anche informazioni sulla presenza di effetti tossici negli organi bersaglio.

Osservazioni

Osservazioni cliniche generali sulla salute degli animali devono essere effettuate e registrate almeno una volta al giorno, di preferenza ogni giorno alla stessa ora, tenendo conto che, dopo la somministrazione, gli effetti anticipati sono più marcati (54). Almeno due volte al giorno, tutti gli animali vengono esaminati al fine di determinarne la morbilità e la mortalità. Nel caso di studi di più lunga durata tutti gli animali devono essere pesati almeno una volta alla settimana e alla fine della prova. Il consumo di cibo va misurato ad ogni cambio e almeno una volta alla settimana. Se la sostanza chimica in esame è diluita in acqua prima di essere somministrata, il consumo di acqua va misurato ad ogni cambio dell'acqua e almeno una volta alla settimana. Gli animali che manifestano segni di eccessiva, ma non letale, tossicità vanno soppressi prima della fine del test e non sono di norma utilizzati per il test della cometa.

Raccolta dei tessuti

Poiché è possibile studiare l'induzione delle rotture di filamenti di DNA (comete) in praticamente tutti i tessuti, è necessario definire in modo chiaro le ragioni della selezione dei tessuti, richiamandosi ai motivi alla base dello studio e a eventuali dati relativi all'ADME, alla genotossicità, cancerogenicità e altri dati relativi alla tossicità delle sostanze chimiche in esame. Tra i fattori importanti da tenere in considerazione figurano la via di somministrazione (basata sulle probabili vie di esposizione dell'uomo), la distribuzione e l'assorbimento previsti nei tessuti, il ruolo del metabolismo e i possibili meccanismi di azione delle sostanze chimiche in esame. Tra i tessuti il fegato è quello più frequentemente studiato e per il quale esistono più dati. Pertanto, in assenza di informazioni generali e qualora non sia stato individuato un tessuto specifico di interesse, la scelta del fegato è giustificata in quanto si tratta del sito principale del metabolismo xenobiotico ed è sovente altamente esposto sia alle sostanze madri sia ai metaboliti. In alcuni casi l'esame di un punto di contatto diretto (ad esempio, per le sostanze chimiche somministrate per via orale, lo stomaco ghiandolare o il duodeno/digiuno o, per

▼M7

le sostanze chimiche inalate, i polmoni) può rivelarsi estremamente importante. Tessuti complementari o differenti possono essere selezionati per ragioni attinenti all'esecuzione del test; può essere tuttavia utile esaminare diversi tessuti provenienti dallo stesso animale, purché il laboratorio abbia dimostrato la propria competenza per tali tessuti e la propria capacità di manipolare diversi tessuti allo stesso tempo.

Preparazione dei campioni

Per le operazioni descritte nei punti che seguono (44-49) è importante che tutte le soluzioni o sospensioni stabili siano utilizzate prima della data di scadenza o, se necessario, siano preparate sul momento. Inoltre, nei punti che seguono, il tempo impiegato per i) rimuovere ciascun tessuto dopo la necropsia, ii) trattare ciascun tessuto per ottenere sospensioni di cellule/nuclei e iii) trattare la sospensione e preparare i vetrini è considerato una variabile critica (cfr. le definizioni nell'appendice 1) e la durata di ciascuna delle operazioni descritte deve essere determinata in fase di definizione del metodo e dimostrazione delle competenze.

Gli animali vengono soppressi conformemente alla legislazione in vigore in materia di benessere degli animali e al principio delle tre R nel o nei momenti adeguati dopo l'ultima somministrazione della sostanza chimica in esame. I tessuti selezionati sono prelevati e sezionati; una porzione è prelevata per il test della cometa e contemporaneamente una sezione della stessa parte di tessuto è tagliata e messa in una soluzione di formaldeide o in un'adeguata soluzione fissativa per un'eventuale analisi istopatologica (cfr. punto 55) applicando i metodi standard (12). Il tessuto destinato al test della cometa è messo in un tampone di macerazione, è lavato accuratamente con tale tampone per rimuovere il sangue residuo e conservato in un tampone di macerazione refrigerato fino al trattamento. Si può inoltre realizzare una perfusione *in situ*, ad esempio, per il fegato e i reni.

In letteratura sono pubblicati diversi metodi per l'isolamento delle cellule/nuclei. Tra questi figurano la macerazione di tessuti quali il fegato e i reni, il raschiamento delle mucose nel caso del tratto gastrointestinale, l'omogeneizzazione e la digestione enzimatica. Poiché lo studio di convalida del JaCVAM si è limitato allo studio di cellule isolate, l'uso di queste ultime va privilegiato per poter definire il metodo e fare riferimento ai dati sperimentali del JaCVAM nella fase di dimostrazione delle competenze. Tuttavia è stato dimostrato che l'uso di cellule isolate o di nuclei non produceva differenze significative nei risultati del test della cometa. Anche l'applicazione di metodi differenti per isolare le cellule/nuclei (ad esempio, omogeneizzazione, macerazione, digestione enzimatica e filtrazione con setaccio) ha prodotto risultati comparabili (55). Di conseguenza è possibile utilizzare sia cellule isolate sia nuclei. I laboratori devono valutare e convalidare accuratamente i metodi di isolamento di cellule/nuclei in funzione del tipo di tessuto. Come indicato al punto 40, la durata di determinate lesioni che provocano la rottura di filamenti del DNA, individuate dal test della cometa, può essere molto breve (52) (53). Pertanto, qualunque sia il metodo utilizzato per preparare le sospensioni delle singole cellule/nuclei, è importante che i tessuti siano trattati prima possibile dopo la soppressione degli animali e conservati in condizioni tali da evitare la scomparsa delle lesioni (ad esempio, mantenendo il tessuto a temperature basse). Le sospensioni contenenti le cellule devono essere conservate a temperature molto basse fino a quando possono essere utilizzate, così da poter evidenziare una differenza minima tra i campioni e adeguate risposte dei controlli positivi e negativi.

▼M7

PREPARAZIONE DEI VETRINI

La preparazione dei vetrini deve avvenire il prima possibile dopo la preparazione delle cellule /nuclei (idealmente entro un'ora), ma la temperatura e il tempo intercorso tra la soppressione dell'animale e la preparazione dei vetrini devono essere rigorosamente controllati e validati in condizioni di laboratorio. Il volume della sospensione contenente le cellule aggiunta all'agarosio con basso punto di fusione (in genere 0,5-1,0 %) per preparare i vetrini non deve ridurre la percentuale di agarosio con basso punto di fusione a meno di 0,45 %. La densità ottimale delle cellule viene determinata con il sistema di analisi delle immagini utilizzato per il conteggio delle comete.

Lisi

Anche le condizioni di lisi costituiscono una variabile critica e possono interferire con le rotture di filamenti derivanti dalle modifiche di specifici tipi di DNA (alchilazioni e addotti alla base del DNA). Si raccomanda pertanto di mantenere le condizioni di lisi il più costanti possibile per tutti i vetrini di uno stesso esperimento. Una volta pronti, i vetrini devono essere immersi in una soluzione di lisi refrigerata per almeno un'ora (o tutta la notte) a una temperatura di 2-8 °C in condizioni di luce attenuata, ad esempio luce gialla o ambiente a tenuta di luce, per evitare l'esposizione alla luce bianca che può contenere componenti UV. Dopo il periodo di incubazione i vetrini devono essere lavati per rimuovere il detergente o i sali residui prima della fase alcalina. A tal fine si può utilizzare acqua depurata, un tampone neutralizzante o un tampone fosfato o anche un tampone di elettroforesi. In questo modo è possibile mantenere le condizioni alcaline nella camera di elettroforesi.

Svolgimento e elettroforesi

I vetrini sono piazzati a caso sulla piattaforma di un'unità di elettroforesi di tipo sottomarino contenente una soluzione di elettroforesi in quantità sufficiente per coprire completamente le superfici dei vetrini (anche la profondità di immersione deve essere costante tra le serie). In altri tipi di unità di elettroforesi utilizzate per il test della cometa, a raffreddamento attivo, circolazione del liquido di raffreddamento e alimentazione in alta tensione, l'intensità della corrente elettrica, a tensione costante, è tanto più elevata quanto più è consistente la copertura della soluzione. È necessario ripartire i vetrini in modo equilibrato nella vaschetta dell'elettroforesi per limitare gli effetti di eventuali tendenze o gli effetti di bordo all'interno della vaschetta o per ridurre al minimo le variazioni tra i lotti; per questi motivi in ciascuna sequenza di elettroforesi si deve utilizzare lo stesso numero di vetrini provenienti dallo stesso animale, nonché campioni di differenti gruppi di trattamento, controlli positivi e negativi. I vetrini devono restare per almeno 20 minuti nella vaschetta per consentire lo svolgimento del DNA e quindi essere sottoposti a elettroforesi in condizioni controllate che permettano di massimizzare la sensibilità e l'intervallo dinamico del test (per ottenere percentuali accettabili di DNA di coda, nei controlli positivi e negativi, e massimizzare così la sensibilità). Il grado di migrazione del DNA è associato in modo lineare alla durata dell'elettroforesi oltre che al potenziale (V/cm). Secondo lo studio del JaCVAM quest'ultimo potrebbe essere pari a 0,7 V/cm per almeno 20 minuti. La durata dell'elettroforesi è considerata una variabile critica e dovrebbe essere impostata in modo da ottimizzare l'intervallo dinamico. Tempi di elettroforesi più lunghi (ad esempio, 30 o 40 minuti per massimizzare la sensibilità) si traducono in genere in risposte positive più nette nel caso di mutageni conosciuti. Tuttavia, tempi di elettroforesi più lunghi possono determinare anche una migrazione eccessiva nei campioni di controllo. Ogni esperimento deve essere realizzato a tensione costante e la variabilità degli altri parametri deve esse contenuta all'interno di un intervallo ristretto e definito; a titolo di esempio, nello studio del JaCVAM, 0,7 V/cm con un'intensità iniziale di 300 mA. La profondità del tampone deve essere in funzione delle condizioni richieste e va mantenuta per tutto l'esperimento. Si deve registrare la corrente all'inizio e alla fine della fase di elettroforesi. Le condizioni ottimali devono pertanto essere determinate nella fase

▼M7

iniziale di dimostrazione delle competenze del laboratorio con ciascun tessuto oggetto di studio. La temperatura della soluzione di elettroforesi in fase di svolgimento e elettroforesi deve essere mantenuta a un livello ridotto, di solito 2-10 °C (10). Si deve registrare la temperatura della soluzione di elettroforesi in fase di svolgimento e all'inizio e alla fine dell'elettroforesi.

Una volta conclusa l'elettroforesi i vetrini devono essere immersi/lavati nel tampone neutralizzante per almeno 5 minuti. I gel possono essere colorati e osservati allo stato «fresco» (ad esempio, entro 1-2 giorni) oppure essere disidratati e analizzati in una fase successiva (ad esempio, 1-2 settimane dopo la colorazione) (56). Tuttavia, le condizioni devono essere convalidate durante la dimostrazione di competenza e, per ciascuna delle opzioni, è necessario acquisire, e conservare separatamente, dati storici. Qualora si opti per la seconda possibilità, i vetrini sono disidratati per immersione di almeno cinque minuti in etanolo assoluto, sono lasciati asciugare all'aria aperta e conservati a temperatura ambiente o in un recipiente in frigorifero fino alla lettura.

Metodi di misurazione

Per la valutazione quantitativa delle comete si utilizzano sistemi di analisi dell'immagine parzialmente o totalmente automatizzati. I vetrini sono colorati utilizzando un adeguato colorante fluorescente, ad esempio SYBR Gold, Green I, ioduro di propidio o bromuro di etidio, e sono misurati con un ingrandimento adeguato (ad esempio, 200x) utilizzando un microscopio a epifluorescenza munito di rilevatori adeguati o di una fotocamera digitale (ad esempio, CCD).

Le cellule possono essere classificate in tre categorie, come descritto nell'atlante delle immagini delle comete (57), ovvero cellule misurabili, non misurabili e «fantasma» (cfr. punto 56 per una discussione più approfondita). Per evitare artefatti, soltanto le cellule misurabili (con testa e coda chiaramente definite e nessuna interferenza da parte di cellule vicine) possono essere classificate in funzione della percentuale di DNA di coda. Non è necessario registrare la frequenza delle cellule non misurabili. La frequenza delle cellule fantasma è determinata sulla base di un esame visivo (in quanto l'assenza di una testa chiaramente definita ne rende difficile l'individuazione mediante analisi dell'immagine) di almeno 150 cellule per campione (cfr. punto 56 per ulteriori informazioni) e documentata a parte.

Tutti i vetrini dell'analisi, compresi quelli dei controlli positivi e negativi, devono essere codificati individualmente ed esaminati «alla cieca» affinché la persona che effettua l'analisi non sappia a quale trattamento corrispondono. Per ciascun campione (per tessuto e per animale) si devono analizzare almeno 150 cellule (escluse le cellule fantasma — cfr. punto 56). L'analisi di 150 cellule per animale in almeno 5 animali per dose (ma in un numero inferiore nel concomitante controllo positivo — cfr. punto 29) garantisce una potenza statistica adeguata secondo l'analisi di Smith *et al*., 2008 (5). Se sono utilizzati i vetrini, ciò può corrispondere a 2 o 3 vetrini analizzati per campione quando sono utilizzati cinque animali per gruppo. È necessario osservare diverse aree del vetrino a una densità tale da garantire che non vi sia sovrapposizione delle code. Va evitata la valutazione ai margini del vetrino.

Le rotture di filamenti di DNA nel test della cometa possono essere misurate sulla base di parametri indipendenti, quali la percentuale di DNA di coda, la lunghezza della coda e il momento di coda. Le tre misurazioni possono essere effettuate utilizzando un programma adeguato di analisi dell'immagine. Tuttavia, la percentuale del DNA di coda (nota anche come intensità percentuale di coda) è il parametro raccomandato per la valutazione e l'interpretazione dei risultati (12) (40) (41) (42) ed è determinata dall'intensità dei frammenti di DNA nella coda espressa come percentuale dell'intensità totale della cellula (13).

▼M7

Lesioni dei tessuti e citotossicità

Risultati positivi nel test della cometa possono non essere dovuti esclusivamente alla genotossicità e la tossicità del tessuto bersaglio può anche tradursi in un aumento della migrazione del DNA (12) (41). Al contrario, una citotossicità bassa o moderata viene spesso riscontrata in presenza di sostanze genotossiche conosciute (12), dimostrando che il test della cometa da solo non consente di distinguere la migrazione del DNA indotta dalla genotossicità rispetto a quella provocata dalla citotossicità. Tuttavia, quando si osserva un aumento nella migrazione del DNA, si raccomanda di effettuare l'esame di uno o più indicatori della citotossicità come ausilio all'interpretazione dei risultati. Un aumento della migrazione del DNA in presenza di chiari segni di citotossicità deve essere interpretato con cautela.

Tra i numerosi criteri di valutazione della citotossicità proposti, le alterazioni istopatologiche sono considerate un criterio pertinente per valutare la tossicità dei tessuti. La migrazione del DNA è stata associata anche a infiammazioni, infiltrazioni cellulari, cambiamenti apoptotici o necrotici; tuttavia, come dimostrato dallo studio di convalida del JaCVAM (12), non si dispone di un elenco definitivo dei cambiamenti istopatologici che sono sempre associati a un aumento della migrazione del DNA. Anche i cambiamenti che interessano alcuni parametri biologici (ad esempio, AST, ALT) possono fornire utili informazioni sui danni ai tessuti; possono inoltre essere considerati anche altri indicatori, quali l'attivazione delle caspasi, la rilevazione delle cellule in fase di apoptosi con il metodo TUNEL, la colorazione con annessina V, ecc. Tuttavia i dati pubblicati in relazione all'utilizzo di tali indicatori negli studi in vivo sono pochi e non tutti affidabili.

Le cellule fantasma sono cellule la cui immagine al microscopio consiste di una testa di piccole dimensioni, se non inesistente, e di una grande coda diffusa e, per quanto la causa di questo fenomeno sia incerta (cfr. appendice 3), sono considerate cellule fortemente danneggiate. Dato l'aspetto di tali cellule, la misurazione della percentuale di DNA di coda mediante l'analisi dell'immagine è inaffidabile; le cellule fantasma devono pertanto essere analizzate a parte. La presenza di cellule fantasma deve essere rilevata e registrata e un loro eventuale aumento che si ritiene sia dovuto alla sostanza chimica in esame deve essere analizzato e interpretato con attenzione. A tal fine può aiutare la conoscenza del meccanismo di azione potenziale delle sostanze chimiche in esame.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

Poiché l'unità sperimentale è data dall'animale è opportuno presentare in forma di tabella sia i risultati relativi ai singoli animali sia la sintesi dei risultati. Data la natura gerarchica dei dati, si raccomanda di determinare la percentuale mediana di DNA di coda per ciascun vetrino e di calcolare per ciascun animale la media dei valori della mediana (12). La media di un gruppo è quindi determinata facendo la media delle medie individuali dei gruppi che lo compongono. Tutti questi valori devono essere riportati nella relazione. Metodologie alternative (cfr. punto 53) sono ammesse, purché scientificamente e statisticamente giustificate. L'analisi statistica può essere svolta applicando diverse metodologie (58) (59) (60) (61). Nel selezionare i metodi statistici da utilizzare si deve tenere conto dell'eventuale necessità di trasformare i dati (ad esempio, in logaritmi o radici quadrate) e/o di aggiungere un numero piccolo (ad esempio, 0,001) a tutti i valori (anche a quelli non nulli), per attenuare l'incidenza dei valori nulli, come illustrato nei riferimenti sopracitati. Nell'appendice 2 sono riportate informazioni sulle interazioni trattamento/sesso, quando vengono utilizzati entrambi i sessi e la successiva analisi dei dati a seconda che siano riscontrate o no differenze. Nella relazione devono figurare inoltre dati sulla tossicità e i segni clinici.

Criteri di accettabilità

L'accettazione dei risultati di una prova si basa sui criteri seguenti:

a. i dati relativi al concomitante controllo negativo si considerano accettabili ai fini della loro aggiunta alla banca dati storica del laboratorio sui controlli negativi, come illustrato al punto 16;

▼M7

b. i concomitanti controlli positivi (cfr. punto 29) devono provocare risposte compatibili con quelle generate nella banca dati storica dei controlli positivi e produrre un incremento statisticamente significativo rispetto ai concomitanti controlli negativi;

c. è stato analizzato un numero adeguato di cellule e dosi (punti 52 e 36-38);

d. i criteri di selezione della dose più elevata sono coerenti con quelli descritti al punto 36.

Analisi e interpretazione dei risultati

A condizione che siano stati rispettati tutti i criteri di accettabilità, una sostanza chimica in esame è considerata chiaramente positiva se:

a. almeno una delle dosi sperimentali presenta un incremento statisticamente significativo rispetto al concomitante controllo negativo;

b. un metodo adeguato di analisi della tendenza evidenzia che l'aumento è collegato alla dose;

c. taluni risultati si collocano al di fuori della distribuzione dei dati dei controlli negativi storici per una data specie, mezzo disperdente, tessuto e numero di somministrazioni.

Se sono rispettati tutti i criteri di cui sopra, si ritiene che la sostanza chimica in esame sia in grado di provocare rotture dei filamenti di DNA nei tessuti studiati nel presente sistema di prova. Si veda il punto 62 se sono soddisfatti soltanto uno o due dei criteri summenzionati.

A condizione che siano stati rispettati tutti i criteri di accettabilità, una sostanza chimica in esame è considerata chiaramente negativa se:

a. nessuna delle concentrazioni sperimentali presenta un incremento statisticamente significativo rispetto al concomitante controllo negativo;

b. un metodo adeguato di analisi della tendenza evidenzia che non vi è un aumento correlato alla concentrazione;

c. tutti i risultati si collocano all'interno della distribuzione dei dati dei controlli negativi storici per una data specie, mezzo disperdente, tessuto e numero di somministrazioni;

d. vi sia prova diretta o indiretta dell'esposizione del o dei tessuti bersaglio o della tossicità per tali tessuti.

In questi casi si ritiene che la sostanza chimica in esame non sia in grado di provocare rotture dei filamenti di DNA nei tessuti studiati nel presente sistema di prova.

Non è necessario verificare una risposta palesemente positiva o negativa.

Qualora la risposta non sia né chiaramente positiva né chiaramente negativa (ovvero non sono rispettati tutti i criteri elencati ai punti 59 e 60), e al fine di stabilire la rilevanza biologica di un risultato, i dati devono essere sottoposti alla valutazione di esperti e/o devono essere effettuati ulteriori accertamenti, se ciò è scientificamente giustificato. Può essere utile, se del caso, analizzare cellule supplementari o ripetere l'esperimento, eventualmente in condizioni sperimentali migliori (ad esempio, intervallo tra le dosi, altre vie di somministrazione, momenti campionamento diversi, altri tessuti).

In rari casi, anche dopo ulteriori analisi, quando la serie di dati non consente di valutare i risultati come positivi o negativi, i risultati sono dichiarati ambigui.

▼M7

Per valutare la rilevanza biologica di un risultato positivo o ambiguo, sono necessarie informazioni sulla citotossicità del tessuto bersaglio (cfr. punti 54-55). Se risultati positivi o ambigui sono riscontrati soltanto in presenza di chiare indicazioni di citotossicità, lo studio è dichiarato ambiguo per quanto riguarda la genotossicità, a meno di non possedere sufficienti informazioni che permettano di trarre conclusioni definitive. Qualora lo studio dia un risultato negativo in presenza di segni di tossicità con tutte le dosi sperimentali, può essere consigliabile effettuare un ulteriore studio con dosi non tossiche.

Relazione sulla prova

La relazione deve comprendere i seguenti dati:

Sostanza chimica in esame

— origine, numero del lotto se disponibile;

— stabilità della sostanza chimica in esame, data limite di utilizzo, data della nuova analisi, se nota.

Sostanza mono-costituente

— apparenza fisica, idrosolubilità, altre proprietà fisico-chimiche pertinenti;

— identificazione chimica, quale nome IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale, purezza, identità chimica delle impurità, se del caso e praticabile, ecc.

Sostanza multi-costituente, UVCB e miscele:

— caratterizzazione, nella misura del possibile mediante identità chimica (vedi sopra), proporzioni quantitative e pertinenti proprietà fisico-chimiche dei costituenti.

Solvente/mezzo disperdente:

— motivazione della scelta del solvente/mezzo disperdente;

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente/mezzo disperdente, se note;

— preparazione delle formulazioni delle dosi;

— determinazione analitica dei preparati (ad esempio, stabilità, omogeneità, concentrazioni nominali).

Animali da esperimento:

— specie/ceppo utilizzato e giustificazioni scientifiche ed etiche della scelta effettuata;

— numero, età e sesso degli animali;

— provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, arricchimento ecc.;

— peso dei singoli animali all'inizio e alla fine del test, con intervallo, media e deviazione standard per ciascun gruppo.

Condizioni sperimentali:

— dati sui controlli positivi e negativi (mezzo disperdente/solvente);

▼M7

— risultati dello studio per determinare l'intervallo delle dosi, se effettuato;

— criteri di selezione delle dosi;

— dettagli della preparazione della sostanza in esame;

— modalità precise di somministrazione della sostanza chimica in esame;

— criteri di selezione della via di somministrazione;

— punto dell'iniezione (nel caso degli studi per via sottocutanea o endovenosa);

— metodo di preparazione dei campioni, se disponibile, analisi istopatologiche, soprattutto nel caso di una sostanza chimica che dà un risultato positivo al test della cometa;

— motivazione della scelta del tessuto;

— metodi atti a verificare che la sostanza in esame ha raggiunto il tessuto bersaglio o la circolazione sanguigna, se i risultati sono negativi;

— dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno) calcolata in funzione della concentrazione (ppm) della sostanza chimica in esame contenuta nella dieta/acqua da bere e del consumo, se del caso;

— dettagli relativi alla qualità della dieta e dell'acqua;

— descrizione dettagliata dei tempi necessari per il trattamento e il campionamento e giustificazione delle scelte (ad esempio dati tossicocinetici, se disponibili);

— metodi di attenuazione del dolore, analgesici;

— metodo di soppressione degli animali;

— procedure di isolamento e di conservazione dei tessuti;

— metodo utilizzato per preparare le sospensioni delle singole cellule/nuclei;

— origine e numeri di lotto di tutti i reagenti (laddove possibile);

— metodi di valutazione della citotossicità;

— condizioni dell'elettroforesi;

— tecniche di colorazione utilizzate; e

— metodi di valutazione e misurazione delle comete.

Risultati:

— Eventuali osservazioni cliniche generali, prima e durante il test per ogni animale;

— prove della citotossicità, se del caso;

▼M7

— per studi di durata superiore alla settimana: peso dei singoli animali durante lo studio, con intervallo di peso, media e deviazione standard per ciascun gruppo; consumo di cibo;

— relazione dose-risposta, se evidente;

— per ciascun tessuto/animale, percentuale di DNA di coda (o eventuali altre misurazioni scelte) e valori mediani per vetrino, valori medi per animale e valori medi per gruppo;

— dati sui controlli negativi storici e concomitanti, con intervalli, medie/mediane e deviazioni standard per ciascun tessuto studiato;

— dati sui controlli positivi concomitanti e storici;

— per i tessuti diversi dal fegato, la curva dose-risposta utilizzando il controllo positivo. La curva può essere stabilita utilizzando i dati raccolti in fase di dimostrazione delle competenze (cfr. i punti 16-17) e deve essere opportunamente giustificata, richiamandosi alla letteratura attuale, dimostrando che l'ampiezza e la dispersione delle risposte ai controlli nei tessuti studiati sono appropriate;

— analisi statistiche e metodi applicati; e criteri in base ai quali una risposta è considerata positiva, negativa o ambigua;

— frequenza delle cellule fantasma in ciascun gruppo e per animale.

Discussione dei risultati

Conclusione

Riferimenti

BIBLIOGRAFIA

(1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing in vivo, *Mutation Research*, Vol. 654/2, pp. 114-32.

(2) Brendler-Schwaab, S. *et al*. (2005), The in vivo Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, pp. 245-54.

(3) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the in vivo Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31-5.

(4) Burlinson, B. (2012), The in vitro and in vivo Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 143-63.

(5) Smith, C.C. *et al*. (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 233-40.

(6) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, pp. 45-51.

(7) McKelvey-Martin, V.J. *et al*. (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, pp. 47-63.

(8) Tice, R.R. *et al*. (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 206-21.

▼M7

(9) Singh, N.P. *et al*. (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, pp. 184-91.

(10) Rothfuss, A. *et al*. (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, pp. 40-69.

(11) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(12) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the* in vivo *rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

(13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the «Comet» assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, pp. 86-94.

(14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, pp. 207-14.

(15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, pp. 249-61.

(16) Rothfuss, A. *et al*. (2011), Improvement of in vivo genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-20.

(17) Kushwaha, S. *et al*. (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, pp. 145–54.

(18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the in vivo Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 187-99.

(19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, pp. 7-19.

(20) Recio, L. *et al*. (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, pp. 149-62.

(21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 621-3.

(22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations,** *Mutagenesis*, Vol. 19/1, pp. 51-9.

(23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, pp. 28-41.

(24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, pp. 175-8.

▼M7

(25) Toyoizumi, T. *et al*. (2011), Use of the in vivo skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, pp. 175-80.

(26) Struwe, M. *et al*. (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, pp. 240-9.

(27) Wada, K. *et al*. (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, pp. 26-30.

(28) Wang, A. *et al*. (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, pp. 51-9.

(29) Burlinson, B. *et al*. (2007), *In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 31-5.

(30) Jackson, P. *et al*. (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, pp. 486-500.

(31) Sasaki, Y.F. *et al*. (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, pp. 629-799.

(32) Sekihashi, K. *et al*. (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 53-74.

(33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity,** *Mutation Research*, Vol. 681/1, pp. 3-12.

(34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, pp. 275-282.

(35) Cordelli, E. *et al*. (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, pp. 443-451.

(36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, pp. 167-72.

(37) Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 196-201.

(38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 165-81.

(39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay,** *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, pp. 267-282.

▼M7

(40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605(1-2), pp. 7-16.

(41) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the in vivo Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, pp. 31-5.

(42) Kumaravel, T.S. *et al*. (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, pp. 53-64.

(43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, pp. 689-95.

(44) Møller, P. *et al*. (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 109-11.

(45) Forchhammer, L. *et al*. (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 113-23.

(46) Azqueta, A. *et al*. (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, pp. 41-45.

(47) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* John Wiley and Sons, New York 2nd ed.

(49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123)

(50) Capitolo B.8 del presente allegato, Tossicità subacuta per inalazione: studio a 28 giorni.

(51) Capitolo B.29 del presente allegato, Tossicità subacuta per inalazione: studio a 90 giorni.

(52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, pp. 141-45.

(53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, pp. 35-41.

(54) OECD (2002), «Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for in vivo rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, pp. 50-4.

(56) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, pp.45–51.

(57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.

(58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of in vivo and in vitro Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, pp. 109-19.

▼**M7**

(59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 167-75.

(60) Bright, J. *et al*. (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, pp. 485-93.

(61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 171-82.

▼**M7**

Appendice 1

DEFINIZIONI

Elettroforesi di cellule isolate in gel in condizioni alcaline: tecnica sensibile per l'individuazione di lesioni primarie del DNA a livello di singole cellule/nuclei.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Cometa: la forma, simile a quella di una cometa, che i nucleotidi assumono dopo essere stati esposti a un campo elettroforetico: la testa corrisponde al nucleo e la coda è costituita dal DNA che migra al di fuori del nucleo nel campo elettrico.

Parametro critico/variabile critica: la variabile di un protocollo per il quale una piccola modifica può avere un grande impatto sulla conclusione del test. Le variabili critiche possono essere specifiche di un tessuto. Le variabili critiche non devono essere modificate, soprattutto nell'ambito di un test, senza tenere conto dell'incidenza che tali modifiche possono avere sulla risposta al test, come indicato ad esempio dall'ampiezza e dalla variabilità della risposta dei controlli positivi e negativi. La relazione sulla prova deve precisare le modifiche apportate alle variabili critiche nel corso del test o in rapporto al protocollo standard del laboratorio e fornire una giustificazione di ogni modifica.

Intensità della coda o percentuale del DNA di coda: corrisponde all'intensità della coda della cometa in rapporto all'intensità totale (testa più coda). Essa riflette la portata (espressa in percentuale) delle lesioni del DNA.

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

UVCB: sostanze la cui composizione non è conosciuta o è variabile, prodotti di una reazione complessa o i materiali origine biologica.

▼M7

Appendice 2

MODELLO FATTORIALE PER INDIVIDUARE LE DIFFERENZE TRA I SESSI NEL TEST DELLA COMETA IN VIVO

Modello fattoriale e relativa analisi

Questo modello prevede di esporre 5 maschi e 5 femmine a ciascuna concentrazione sperimentale e comporta pertanto l'utilizzo di un minimo di 40 animali (20 maschi e 20 femmine più i relativi controlli positivi).

Il modello qui presentato — una delle forme semplici del modello fattoriale — è equivalente a un'analisi della varianza a due fattori, in cui il sesso e il livello delle concentrazioni costituiscono i fattori principali. I dati possono essere analizzati utilizzando diversi programmi statistici standard, quali SPSS, SAS, STATA, Genstat o il programma R.

A partire dall'insieme dei dati si determina la variabilità tra i sessi e le concentrazioni, nonché la variabilità relativa alle interazioni tra sessi e concentrazioni. Ciascuno di questi aspetti è quindi valutato in rapporto alla stima della variabilità tra gli animali ripartiti nei gruppi di animali dello stesso sesso esposti alle stesse concentrazioni. Maggiori informazioni su questa metodologia sono reperibili in diversi manuali standard di statistica (cfr. bibliografia), nonché nelle schede «di aiuto» fornite con i programmi statistici.

In seguito viene esaminata l'interazione sesso x concentrazione in una tabella ANOVA ([1]). In assenza di un termine di interazione significativo la combinazione dei valori inter-sessi o inter-livelli di concentrazione consente di effettuare test statistici validi tra i livelli, basandosi sul termine di variabilità intra-gruppo combinata di 'ANOVA.

L'analisi prosegue suddividendo la variabilità stimata tra le concentrazioni in modo da ottenere contrasti che permettano di stabilire contrasti lineari e quadratici delle risposte per l'insieme dei livelli di concentrazione. Quando si riscontra un'interazione significativa sesso x concentrazione, questo termine può essere a sua volta in ripartito in contrasti di interazione lineare x sesso e quadratica x sesso. In questo modo si può verificare se le risposte alle concentrazioni sono parallele per i due sessi o se vi è una differenza riconducibile al sesso.

La stima della variabilità intra-gruppo combinata può essere utilizzata per verificare lo scarto tra le medie, confrontandole due a due. I confronti possono essere effettuati tra le medie per i due sessi e tra le medie dei diversi livelli delle concentrazioni (come, ad esempio, confronti tra i livelli dei controlli negativi). Nei casi in cui si registra un'interazione significativa i confronti possono essere effettuati tra le medie di concentrazioni diverse per lo stesso sesso o tra le medie dei due sessi a parità di concentrazione.

Riferimenti

Numerosi manuali di statistica esaminano la teoria, la concezione, la metodologia, l'analisi e l'interpretazione dei modelli fattoriali, dall'analisi più semplice, a due fattori, alle forme più complesse utilizzate per la metodologia *Design of Experiment*. Di seguito ne è riportato un elenco non completo. Alcuni manuali forniscono esempi di modelli comparabili e, in alcuni casi, forniscono un codice che permette di effettuare l'analisi utilizzando diversi programmi.

([1]) Gli statistici che applicano una metodologia di modellizzazione quale l'utilizzo dei modelli lineari generalizzati (GLM) possono effettuare l'analisi in modo diverso ma comparabile, senza tuttavia ricavare necessariamente la tradizionale tabella ANOVA che risale a concetti algoritmici del calcolo statistico elaborati in epoca preinformatica.

▼**M7**

(1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

(2) Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

(3) Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

(4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

(5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

(6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

(7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

Appendice 3

LIMITI ATTUALI DEL TEST

Allo stato attuale delle conoscenze, il test della cometa in vivo presenta diversi limiti. Ci si aspetta che tali limiti siano ridotti, o che siano definiti in modo più preciso via via che la maggiore esperienza acquisita nell'applicazione del test fornirà risposte alle questioni di sicurezza in un contesto regolamentare.

1. Alcuni tipi di lesioni del DNA possono essere di breve durata, ovvero possono essere riparate in tempi troppo rapidi per poter essere osservate 24 ore o più dopo la somministrazione dell'ultima dose. Non esiste un elenco convalidato dei tipi di lesioni di breve durata, né delle sostanze chimiche che sono probabilmente alla base di tali tipi di lesioni; si ignora altresì l'arco temporale durante il quale tali tipi di lesioni sono individuabili. I momenti ottimali per il campionamento possono inoltre essere specificamente legati alla sostanza chimica o alla via di somministrazione e i momenti di campionamento devono essere determinati in funzione dei dati cinetici, (ad esempio, il tempo T_{max} in cui si raggiunge la concentrazione massima nel plasma o tessuto) quando tali dati sono disponibili. La maggior parte degli studi su cui si basa il presente metodo di prova sostengono che la necropsia deve intervenire nelle 2-3 ore che seguono la somministrazione dell'ultima dose. La maggior parte degli studi pubblicati indicano che l'ultima dose deve essere somministrata dalle 2 alle 6 ore prima della soppressione dell'animale. È su tale base che il presente metodo di prova raccomanda che, in assenza di dati che inducano a procedere in modo diverso, la dose finale sia somministrata in un momento preciso compreso tra 2 e 6 ore prima della necropsia.

2. Non si dispone di dati convalidati relativi alla sensibilità del test per l'individuazione di lesioni del DNA di breve durata successive alla somministrazione di una sostanza negli alimenti o nell'acqua da bere rispetto alla somministrazione con sonda gastrica. Lesioni del DNA sono state individuate a seguito della somministrazione di una sostanza negli alimenti o nell'acqua da bere ma gli studi condotti con questo tipo di somministrazione sono relativamente poco numerosi rispetto all'esperienza, molto maggiore, acquisita con la somministrazione mediante sonda gastrica o per via intraperitoneale. La sensibilità del test potrebbe pertanto essere ridotta nel caso delle sostanze chimiche che provocano lesioni di breve durata, quando sono somministrate con gli alimenti e l'acqua da bere.

3. Poiché non esistono studi inter-laboratorio su tessuti diversi dal fegato e dallo stomaco, non sono state elaborate raccomandazioni sulle modalità per ottenere una risposta sensibile e riproducibile in tessuti diversi dal fegato, indicando ad esempio gli intervalli attesi per i controlli positivi e negativi. Nel caso del fegato non è stato possibile trovare un accordo sull'abbassamento del limite per i valori dei controlli negativi.

4. Benché esistano diverse pubblicazioni che dimostrano che la citotossicità in vitro possa indurre a interpretazioni erronee, sono stati pubblicati pochissimi dati in vitro e, pertanto, non è possibile raccomandare una particolare misura di citotossicità. La migrazione del DNA è stata associata anche a mutamenti istopatologici quali infiammazioni, infiltrazioni cellulari, cambiamenti apoptotici o necrotici; tuttavia, come dimostrato dallo studio di convalida del JaCVAM (OCSE, 2014), tali cambiamenti non sempre si accompagnano a risultati positivi nel test della cometa e, pertanto, non si dispone di un elenco definitivo dei cambiamenti istopatologici che sono sempre associati a un aumento della migrazione del DNA. È stato proposto di utilizzare le cellule fantasma come indicatore della citotossicità ma l'eziologia di queste cellule resta incerta. Secondo taluni dati le cellule fantasma potrebbero essere il prodotto della citotossicità della sostanza chimica, dei danni di tipo meccanico/enzimatico provocati in fase di preparazione del campione (Guerard *et al*., 2014) e/o di un effetto estremo della genotossicità della sostanza chimica in esame. Altri dati sembrerebbero indicare che esse sono provocate da lesioni del DNA estese ma forse riparabili (Lorenzo *et al*., 2013).

▼M7

5. È stato dimostrato che è possibile congelare i tessuti o i nuclei delle cellule al fine di analizzarli in una fase successiva. Ciò permette in genere di ottenere un effetto misurabile sulla risposta al mezzo disperdente e al controllo positivo (Recio *et al.,* 2010; Recio at al., 2012; Jackson at al., 2013). Se il laboratorio ricorre a questa pratica, deve dimostrare la propria competenza nelle metodologie di congelamento e confermare che le percentuali di DNA di coda nei tessuti bersaglio degli animali trattati con il mezzo disperdente sono a livelli sufficientemente bassi e che è possibile individuare risposte positive. In letteratura sono descritte diverse metodologie per il congelamento dei tessuti. Allo stato attuale, tuttavia, non vi è accordo sulle migliori modalità per congelare e scongelare i tessuti e per valutare se una risposta potenzialmente alterata possa incidere sulla sensibilità del test.

6. Studi recenti dimostrano che l'elenco delle variabili critiche potrebbe continuare a diminuire e che i parametri relativi a tali variabili potrebbero essere definiti con maggiore precisione (Guerard *et al*., 2014).

Riferimenti

(1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114-21.

(2) Jackson, P. *et al*. (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699-707.

(3) Lorenzo, Y. *et al*. (2013), The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427-32.

(4) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the* in vivo *rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

(5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.

(6) Recio, L. *et al*. (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101-13.

▼M8

B.63. PROVA DI SCREENING DELLA TOSSICITÀ PER LA RIPRODUZIONE/LO SVILUPPO

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida n. 421 dell'OCSE (2016). Le linee guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche sono periodicamente rivedute e aggiornate alla luce del progresso scientifico. La linea guida n. 421 sulla prova di screening è stata adottata inizialmente nel 1995, sulla base di un protocollo per una «prova preliminare di screening della tossicità per la riproduzione» di cui si è discusso nell'ambito di due riunioni di esperti, a Londra nel 1990 (1) e a Tokyo nel 1992 (2).

2. Il presente metodo di prova è stato aggiornato mediante l'aggiunta di endpoint pertinenti per il rilevamento di interferenti endocrini, come seguito all'attività ad alta priorità avviata dall'OCSE nel 1998 volta a rivedere le linee guida esistenti e a elaborarne di nuove, per lo screening e la sperimentazione relativi a potenziali interferenti endocrini (3). La linea guida n. 407 dell'OCSE (studio della tossicità orale con somministrazione ripetuta di dosi per 28 giorni sui roditori, corrispondente al capitolo B.7 del presente allegato), ad esempio, è stata migliorata nel 2008 mediante l'aggiunta di parametri adatti per l'individuazione dell'attività endocrina delle sostanze in esame. La linea guida n. 421 è stata aggiornata con l'intento di includere gli endpoint pertinenti per il rilevamento di interferenti endocrini nelle linee guida in cui i periodi di esposizione coprono alcuni dei periodi sensibili dello sviluppo (i periodi precedenti o immediatamente successivi alla nascita).

3. Gli ulteriori endpoint pertinenti per il rilevamento di interferenti endocrini selezionati, che fanno parte anche della linea guida n. 443 (studio esteso di tossicità per la riproduzione su una generazione, corrispondente al capitolo B.56 del presente allegato), sono stati aggiunti alla linea guida n. 421 sulla base di uno studio di fattibilità riguardante questioni scientifiche e tecniche relative alla loro inclusione, come pure gli eventuali adattamenti del disegno sperimentale necessari per la loro inclusione (4).

4. Il presente metodo di prova è inteso a generare informazioni limitate concernenti gli effetti delle sostanze chimiche in esame sulla capacità riproduttiva maschile e femminile, quali la funzione delle gonadi, il comportamento in fase di accoppiamento, il concepimento, lo sviluppo dell'organismo concepito e il parto. Esso non rappresenta un'alternativa ai metodi di prova esistenti B.31, B.34, B.35 e B.56, né li sostituisce.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

5. Il presente metodo di prova di screening può essere utilizzato per fornire informazioni iniziali concernenti i possibili effetti sulla riproduzione e/o lo sviluppo, nella fase iniziale di valutazione delle proprietà tossicologiche delle sostanze chimiche o nella valutazione di sostanze potenzialmente pericolose. Esso può essere utilizzato anche nell'ambito di una serie di prove di screening iniziali per le sostanze chimiche esistenti per le quali le informazioni tossicologiche disponibili sono scarse o inesistenti, come studio volto a determinare gli intervalli di dosaggio per studi più approfonditi sulla riproduzione o sullo sviluppo o in altri casi in cui sia ritenuto opportuno. Durante lo svolgimento dello studio è opportuno seguire i principi guida e le considerazioni di cui al documento di orientamento dell'OCSE n. 19, *Recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* (5).

▼M8

6. Il presente metodo di prova non fornisce informazioni complete su tutti gli aspetti della riproduzione e dello sviluppo. In particolare, esso offre solo mezzi limitati per individuare manifestazioni postnatali di un'esposizione prenatale o effetti eventualmente riconducibili a un'esposizione postnatale. Tenuto conto, tra le altre cose, del numero relativamente ridotto di animali nei gruppi di trattamento, della selettività degli endpoint e della breve durata dello studio, il presente metodo non fornisce prove sufficienti per trarre conclusioni definitive circa l'assenza di effetti. Inoltre, in assenza di dati desunti da altre prove di tossicità per la riproduzione/lo sviluppo, risultati positivi sono utili per una valutazione iniziale dei pericoli e permettono di prendere decisioni circa la necessità di procedere a ulteriori prove e i tempi per effettuarle.

7. I risultati ottenuti per quanto riguarda i parametri endocrini devono essere interpretati alla luce del «Quadro concettuale dell'OCSE per le prove e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino» (6). La linea guida migliorata dell'OCSE n. 421 fa parte del livello 4 di questo quadro concettuale come saggio *in vivo* in grado di fornire dati sugli effetti nocivi sugli endpoint pertinenti per il sistema endocrino. Un segnale endocrino potrebbe tuttavia non essere considerato di per sé una prova sufficiente ad attestare che la sostanza chimica in esame è un interferente endocrino.

8. Il presente metodo di prova prevede la somministrazione orale della sostanza chimica da esaminare. Potrebbero essere necessarie modifiche in caso di utilizzo di altre vie di somministrazione.

9. Prima di applicare il presente metodo di prova a una miscela per generare dati ai fini regolamentari previsti, si deve considerare se, e in caso affermativo, perché, esso possa fornire risultati adeguati a tale scopo. Tali considerazioni non sono necessarie laddove esista una disposizione normativa che obblighi a sottoporre a prova la miscela.

10. L'appendice 1 contiene le definizioni dei termini utilizzati.

PRINCIPIO DELLA PROVA

11. La sostanza chimica in esame viene somministrata in dosi graduate a diversi gruppi di maschi e femmine. Ai maschi le dosi devono essere somministrate per almeno quattro settimane e fino al prima della soppressione programmata, compreso tale giorno (tale periodo comprende un minimo di due settimane prima dell'accoppiamento, il tempo dell'accoppiamento e circa due settimane dopo l'accoppiamento). Tenuto conto della durata limitata del periodo di esposizione prima dell'accoppiamento nei maschi, la fertilità potrebbe non essere un particolare indicatore di sensibilità della tossicità testicolare. È pertanto essenziale un esame istologico particolareggiato delle prove. La combinazione di un periodo di esposizione di due settimane prima dell'accoppiamento (seguito da osservazioni sull'accoppiamento e la fertilità) e di un periodo di esposizione complessivo di almeno quattro settimane (seguito da un dettagliato esame istopatologico delle gonadi maschili) è considerata sufficiente a consentire l'individuazione della maggior parte degli effetti sulla fertilità maschile e sulla spermatogenesi.

12. Alle femmine la sostanza va somministrata durante l'intero studio. Tale periodo comprende due settimane prima dell'accoppiamento (con l'obiettivo di coprire almeno due cicli estrali completi), l'intervallo variabile che precede il concepimento, la durata della gestazione e almeno tredici giorni dopo il parto, fino al giorno precedente alla soppressione programmata, compreso tale giorno.

13. La durata dello studio, dopo l'acclimatazione e la valutazione del ciclo estrale precedente la somministrazione, dipende dal comportamento della femmina ed è di circa 63 giorni [almeno 14 giorni prima dell'accoppiamento, un massimo di 14 giorni per l'accoppiamento, 22 giorni di gestazione, 13 giorni di allattamento].

▼M8

14. Durante il periodo di somministrazione gli animali vengono esaminati attentamente e quotidianamente al fine di rilevare eventuali segni di tossicità. Gli animali deceduti o soppressi durante il periodo della prova vengono sottoposti a necroscopia; al termine della prova gli animali superstiti vengono soppressi e sottoposti a necroscopia.

DESCRIZIONE DEL METODO

Selezione della specie animale

15. Il presente metodo di prova è destinato ad essere utilizzato con i ratti. Se i parametri specificati nel metodo di prova sono studiati in un'altra specie di roditori, occorre fornire una giustificazione dettagliata. Nel programma internazionale di validazione per l'individuazione degli interferenti endocrini nella linea guida n. 407 dell'OCSE (che corrisponde al capitolo B.7 del presente allegato) il ratto è stata l'unica specie animale utilizzata. Non vanno usati ceppi a bassa fecondità o con nota elevata incidenza di difetti dello sviluppo. Si devono utilizzare animali vergini sani, non sottoposti in precedenza a esperimenti. Gli animali utilizzati nella prova devono essere caratterizzati quanto alle specie, al ceppo, al sesso, al peso e all'età. All'inizio dello studio la variazione ponderale degli animali utilizzati deve essere minima e non superare il 20 % del peso medio di ciascun sesso. Per gli studi preliminari a studi a lungo termine o effettuati su un'intera generazione, è preferibile ricorrere in entrambi gli studi ad animali dello stesso ceppo e della stessa provenienza.

Condizioni di stabulazione e alimentazione

16. Tutte le procedure devono attenersi agli standard locali in materia di cura degli animali da esperimento. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °). L'umidità relativa deve raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 % (eccetto nel corso delle pulizie degli ambienti), ma occorre puntare a un valore del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con un fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata di acqua da bere. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di garantire un'adeguata miscela della sostanza chimica in esame, se quest'ultima è somministrata con il cibo.

17. Gli animali devono essere sistemati nelle gabbie in piccoli gruppi dello stesso sesso; possono essere sistemati in gabbie individuali se necessario per ragioni scientifiche. Ciascuna gabbia non deve ospitare più di cinque animali. L'accoppiamento va effettuato in gabbie adeguate allo scopo. Le femmine gravide devono essere tenute in gabbie individuali e rifornite di materiale per la costruzione della tana. Le femmine che allattano vanno poste in gabbie individuali insieme alla prole.

18. L'alimentazione deve essere analizzata periodicamente per verificare la presenza di contaminanti. Un campione del mangime somministrato deve essere conservato fino al completamento della relazione.

Preparazione degli animali

19. Gli animali adulti, sani e giovani vengono suddivisi a caso in gruppi di controllo e gruppi di trattamento. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Gli animali vanno identificati inequivocabilmente e acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno cinque giorni prima dell'inizio dello studio.

Preparazione delle dosi

20. Si raccomanda di somministrare la sostanza chimica in esame per via orale, a meno che non si considerino più appropriate altre vie di somministrazione. Se si sceglie la via orale, la sostanza chimica è generalmente somministrata mediante sonda gastrica; tuttavia, in alternativa, può essere somministrata con la dieta o l'acqua da bere.

▼M8

21. Ove necessario, la sostanza in esame è disciolta o sospesa in un mezzo disperdente adeguato. Si raccomanda di prendere anzitutto in considerazione, ove possibile, l'uso di una soluzione/sospensione acquosa, e in seconda battuta quello di una soluzione/emulsione in olio (ad esempio olio di semi di mais) e infine la possibile soluzione in altri mezzi disperdenti. Le caratteristiche tossiche dei mezzi disperdenti diversi dall'acqua devono essere note. È necessario determinare la stabilità e l'omogeneità della sostanza chimica in esame nel mezzo disperdente.

PROCEDURA

Numero e sesso degli animali

22. Si raccomanda di costituire gruppi di almeno 10 maschi e 12-13 femmine. Nella fase pre-esposizione si procede alla valutazione della ciclicità estrale nelle femmine e gli animali che non presentano un ciclo tipico di 4-5 giorni non sono inclusi nello studio; si raccomanda pertanto di utilizzare un numero supplementare di femmine per ottenere 10 femmine per ciascun gruppo. Eccetto i casi in cui gli effetti tossici sono notevoli, si dovrebbero ottenere per ciascun gruppo almeno 8 femmine gravide, che generalmente è il numero minimo accettabile. Lo scopo è ottenere un numero di gravidanze e nidiate che consenta una valutazione significativa del potenziale della sostanza chimica in esame di influire negativamente sulla fertilità, sulla gravidanza, sul comportamento materno, sulla suzione, sulla crescita e sullo sviluppo della progenie F_1, dal concepimento al tredicesimo giorno dopo il parto.

Dosaggio

23. Si utilizzano generalmente almeno tre gruppi da trattare e un gruppo di controllo. I livelli di dosaggio possono essere basati sulle informazioni derivanti dalle prove di tossicità acuta o sui risultati di studi con dosi ripetute. Fatta eccezione per la somministrazione della sostanza chimica in esame, gli animali del gruppo di controllo devono essere trattati in modo identico agli esemplari dei gruppi sottoposti al trattamento. Se si usa un mezzo disperdente per la somministrazione della sostanza chimica in esame, al gruppo di controllo verrà somministrato il medesimo mezzo disperdente nel volume massimo utilizzato.

24. I livelli di dosaggio devono essere selezionati tenendo conto di tutti i dati disponibili sulla tossicità e le caratteristiche (tossico-)cinetiche. Bisogna inoltre tener conto del fatto che potrebbero esserci differenze di sensibilità tra le femmine gravide e quelle non gravide. Il livello massimo di dosaggio deve essere tale da indurre effetti tossici senza cagionare la morte o sofferenze gravi. Deve essere inoltre definita una serie decrescente di livelli di dosaggio al fine di individuare un'eventuale correlazione dose-risposta e l'assenza di effetti avversi al dosaggio minimo (NOAEL, *no-observed-adverse effects*). In genere, per determinare i livelli decrescenti di dosaggio si consiglia un intervallo con un fattore compreso tra 2 e 4 e spesso è preferibile aggiungere un quarto gruppo di studio piuttosto che avere un intervallo eccessivamente lungo (ad esempio superiore a un fattore 10) fra un dosaggio e l'altro.

25. Nel caso di tossicità generale osservata (ad es. riduzione del peso corporeo, effetti a livello epatico, cardiaco, polmonare o renale ecc.) o di altri cambiamenti che potrebbero non essere dovuti ad effetti tossici (ad es. diminuzione dell'assunzione di alimenti, dilatazione del fegato), gli effetti rilevati sugli endpoint endocrini devono essere interpretati con cautela.

Prova limite

26. Se uno studio orale, effettuato secondo le procedure descritte per il presente studio, con un livello di dosaggio di almeno 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno o in caso di somministrazione con gli alimenti o l'acqua, a una concentrazione equivalente, non produce effetti tossici osservabili e se i dati relativi a sostanze di struttura analoga non indicano tossicità, si può considerare che non è necessario eseguire uno studio completo utilizzando diversi livelli di dosaggio. Si applica la prova limite, tranne quando l'esposizione umana indica la necessità di utilizzare un livello di dosaggio orale più elevato. Per altri tipi di somministrazione, ad esempio inalazione o applicazione cutanea, la concentrazione massima raggiungibile dipende in molti casi dalle proprietà fisico-chimiche delle sostanze chimiche da esaminare.

▼M8

Somministrazione delle dosi

27. Agli animali viene somministrata una dose giornaliera della sostanza chimica in esame sette giorni alla settimana. Se viene effettuata per via intragastrica, la somministrazione deve avvenire in dose singola mediante sonda gastrica o idonea cannula per intubazione. Il volume massimo di liquido che può essere somministrato in una sola volta dipende dalla taglia dell'animale. Il volume non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo, tranne nel caso delle soluzioni acquose che possono essere somministrate in quantità pari a 2 ml/100 g di peso corporeo. Salvo nel caso di sostanze chimiche irritanti o corrosive, i cui effetti di norma tendono a esacerbarsi con l'aumentare della concentrazione, la variabilità del volume somministrato deve essere ridotta al minimo adeguando la concentrazione, in modo da mantenere un volume costante per tutti i livelli di dosaggio.

28. Per le sostanze chimiche somministrate con la dieta o l'acqua da bere è importante impedire che la quantità della sostanza chimica in esame interferisca con la normale alimentazione o il normale bilancio dei liquidi. Se la sostanza chimica in esame è somministrata con la dieta, si può utilizzare una concentrazione costante nella dieta (ppm) o un livello di dosaggio costante in funzione del peso corporeo di ciascun animale; la scelta di eventuali alternative va specificata. Nel caso di sostanze chimiche somministrate mediante sonda gastrica, la dose va somministrata ogni giorno all'incirca agli stessi orari e regolata almeno settimanalmente per mantenere un livello costante delle dosi rispetto al peso corporeo degli animali.

Protocollo sperimentale

29. La somministrazione della sostanza a entrambi i sessi deve iniziare almeno due settimane prima dell'accoppiamento, dopo un periodo di acclimatazione di almeno cinque giorni e dopo avere osservato nelle femmine un ciclo estrale normale (durante un periodo di pre-trattamento di 2 settimane). Lo studio deve essere programmato in modo tale che la valutazione del ciclo estrale inizi subito dopo il raggiungimento della maturità sessuale completa da parte degli animali. Ciò può variare leggermente a seconda dei ceppi di ratti e dei laboratori, ad esempio 10 settimane per i ratti Sprague Dawley e circa 12 settimane per i ratti Wistar. Le femmine con prole devono essere soppresse il tredicesimo giorno dopo il parto o poco dopo. Il giorno della nascita (ossia quello in cui viene completato il parto) è il giorno 0 post-parto. Le femmine per le quali non vi sono prove di avvenuta copulazione sono soppresse 24-26 giorni dopo l'ultimo giorno del periodo di accoppiamento. La somministrazione della sostanza va continuata, in entrambi i sessi, durante il periodo di accoppiamento. Dopo tale periodo, la somministrazione deve proseguire per i maschi almeno fino al completamento del periodo di dosaggio totale minimo di 28 giorni. I maschi sono in seguito soppressi o, in alternativa, mantenuti in vita e continuano a ricevere la sostanza in esame ai fini di un eventuale secondo accoppiamento, ove ritenuto opportuno.

30. La somministrazione giornaliera delle dosi alle femmine riproduttrici va continuata per tutta la gravidanza e almeno fino al tredicesimo giorno dopo il parto o al giorno prima della soppressione incluso. Per gli studi in cui la sostanza chimica in esame è somministrata tramite inalazione o per via cutanea, la somministrazione deve proseguire almeno fino al diciannovesimo giorno di gestazione incluso e deve essere iniziata di nuovo appena possibile e comunque entro il quarto giorno dopo il parto (PND 4).

31. Un diagramma del calendario della prova è contenuto nell'appendice 2.

Procedura di accoppiamento

32. Nel presente studio si utilizza normalmente il sistema di accoppiamento 1:1 (un maschio per una femmina). Possono essere previste eccezioni in caso di morte occasionale di esemplari maschi. Si deve mettere una femmina con lo stesso maschio fino a quando la copulazione è comprovata o sono trascorse due settimane. Ogni mattina le femmine devono essere esaminate per verificare la presenza di sperma o di tappi vaginali. Il giorno 0 della gravidanza è definito come il giorno in cui si riscontra la prova dell'avvenuta copulazione (presenza di un tappo vaginale o di sperma). Nel caso in cui l'accoppiamento non abbia successo, si può valutare la possibilità di far accoppiare le femmine con maschi di comprovata capacità riproduttiva dello stesso gruppo.

▼M8

Dimensioni della nidiata

33. Il quarto giorno dopo la nascita è possibile uniformare le dimensioni di ogni nidiata eliminando i piccoli in eccesso tramite selezione casuale, in modo da ottenere, nella misura del possibile, quattro o cinque piccoli per sesso per ciascuna nidiata, a seconda delle dimensioni normali della nidiata nei ceppi di ratti utilizzati. I campioni di sangue devono essere prelevati da due dei piccoli in eccedenza, raggruppati e utilizzati per determinare i livelli sierici di T4. L'eliminazione selettiva dei piccoli, ad esempio in base al peso corporeo o alla distanza anogenitale (AGD), non è opportuna. Ogni volta che il numero di piccoli maschi o femmine non permette di avere quattro o cinque animali di ciascun sesso per nidiata, è accettabile una regolazione parziale (ad esempio, sei maschi e quattro femmine). Se le dimensioni della nidiata scendono al di sotto della soglia di uniformazione (8 o 10 piccoli per ciascuna nidiata), nessun piccolo sarà eliminato. Qualora vi sia un solo piccolo al di sopra della soglia di uniformazione, esso sarà eliminato e utilizzato per prelevare il campione di sangue ai fini della determinazione dei livelli sierici di T4.

34. Se le dimensioni della nidiata non sono uniformate, si sacrificano due piccoli per nidiata il quarto giorno dopo la nascita e si prelevano campioni di sangue per valutare la concentrazione sierica degli ormoni tiroidei. Se possibile, nel selezionare i due piccoli per nidiata da sacrificare, scegliere due femmine per tenere da parte i maschi per la valutazione della retrazione del capezzolo, tranne nel caso in cui l'eliminazione di questi piccoli non lasci alcuna femmina per le valutazioni da effettuare al termine. Non bisogna eliminare alcun piccolo se vi sono meno di 8 o 10 piccoli per nidiata (a seconda delle dimensioni normali della nidiata nei ceppi di ratti utilizzati). Qualora vi sia un solo piccolo in più rispetto alle dimensioni normali della nidiata, un solo piccolo sarà eliminato e utilizzato per prelevare il campione di sangue ai fini della determinazione dei livelli sierici di T4.

Osservazioni in vivo

Osservazioni cliniche

35. Durante l'intero periodo della prova, le osservazioni cliniche generali vanno effettuate almeno una volta al giorno, con una frequenza maggiore se si constatano segni di tossicità. Le osservazioni devono essere effettuate preferibilmente ogni giorno alla stessa ora, tenendo conto del periodo probabile di massima intensità degli effetti dopo la somministrazione. Si devono registrare tutte le variazioni comportamentali pertinenti, i segni di parto difficile o prolungato e tutti i sintomi di tossicità, compresa la mortalità. Le registrazioni devono includere il momento dell'insorgenza, la gravità e la durata degli effetti tossici.

Peso corporeo e consumo di cibo/acqua

36. I maschi e le femmine devono essere pesati il primo giorno della somministrazione, in seguito almeno settimanalmente, e al termine della somministrazione. Le femmine devono essere pesate durante la gravidanza i giorni 0, 7, 14 e 20 ed entro 24 ore dal parto (giorno 0 o 1 dopo il parto) e almeno il quarto e il tredicesimo giorno dopo il parto. Queste osservazioni vanno riportate singolarmente per ciascun animale adulto.

37. Durante il periodo precedente l'accoppiamento e durante la gravidanza e l'allattamento, l'assunzione di cibo deve essere misurata almeno una volta alla settimana. La misurazione dell'assunzione di cibo durante l'accoppiamento è facoltativa. Se la sostanza chimica in esame è somministrata con acqua da bere, durante questi periodi va misurata anche l'assunzione di acqua.

Cicli estrali

38. I cicli estrali devono essere monitorati prima dell'inizio del trattamento per selezionare per lo studio femmine aventi una ciclicità regolare (cfr. il paragrafo 22). Vanno monitorati anche gli strisci vaginali, ogni giorno dall'inizio del periodo di trattamento finché l'accoppiamento non risulti avvenuto. Se vi è il sospetto che effetti legati a forte stress all'inizio del

▼M8

trattamento possano alterare i cicli estrali, i laboratori possono esporre gli animali utilizzati nella prova per due settimane e quindi effettuare ogni giorno strisci vaginali per monitorare il ciclo estrale per almeno due settimane iniziando nel periodo precedente l'accoppiamento e proseguendo durante il periodo dell'accoppiamento finché quest'ultimo non risulti avvenuto. Durante il prelievo delle cellule vaginali/cervicali occorre prestare attenzione a non ledere la mucosa per evitare un'eventuale induzione di pseudogravidanza (7) (8).

Parametri relativi alla progenie

39. La durata della gestazione deve essere registrata e calcolata dal giorno 0 di gravidanza. Ogni nidiata deve essere esaminata non appena possibile dopo il parto per stabilire il numero e il sesso dei piccoli, dei nati morti, dei nati vivi e degli esemplari più piccoli del normale (i piccoli di dimensioni molto inferiori ai corrispondenti piccoli di controllo) e la presenza di grosse anomalie.

40. Si procede a contare i piccoli vivi e a identificarne il sesso e a pesare le nidiate entro 24 ore dal parto (giorno 0 o 1 dopo il parto) e almeno il quarto e il tredicesimo giorno dopo il parto. Oltre a quanto osservato al paragrafo 35, deve essere registrato qualsiasi comportamento anomalo della prole.

41. Occorre misurare la distanza anogenitale (AGD) di ogni piccolo nello stesso giorno dalla nascita, tra il PND 0 e il PND 4. Il peso corporeo del piccolo va registrato il giorno in cui ne viene misurata l'AGD, che deve essere normalizzata in funzione della taglia, preferibilmente usando la radice cubica del peso corporeo (9). Va contato il numero di capezzoli/areole nei piccoli di sesso maschile il PND 12 o 13, come raccomandato nella linea guida n. 151 dell'OCSE (10).

Biochimica clinica

42. Vanno prelevati campioni di sangue da un sito specifico in base al seguente programma:

— da almeno due piccoli per nidiata il quarto giorno dopo la nascita, se il numero di piccoli lo consente (cfr. i paragrafi 33-34)

— da tutte le madri e almeno due piccoli di 13 giorni per nidiata al termine dell'esperimento e

— da tutti i maschi adulti, al termine dell'esposizione.

Tutti i campioni di sangue vanno conservati in condizioni adeguate. Si procede alla valutazione della concentrazione sierica per gli ormoni tiroidei (T4) nei campioni di sangue dei piccoli di 13 giorni e degli adulti maschi. Se del caso, si effettua un'ulteriore valutazione dell'ormone T4 nei campioni di sangue delle madri e dei piccoli di 4 giorni. Se opportuno, si possono misurare facoltativamente anche i livelli di altri ormoni. I prelievi di sangue dei piccoli possono essere raggruppati per nidiata ai fini dell'analisi degli ormoni tiroidei. Gli ormoni tiroidei (T4 e TSH) sono misurati di preferenza come «totale».

43. I fattori seguenti possono influenzare la variabilità e le concentrazioni assolute delle analisi ormonali:

— momento della soppressione, per via della variazione diurna delle concentrazioni ormonali;

— metodi di soppressione, evitando di stressare inutilmente gli animali in quanto ciò potrebbe incidere sulle concentrazioni ormonali;

— kit per le analisi ormonali che possono differire per le loro curve standard.

▼M8

44. I campioni di plasma destinati specificatamente all'analisi ormonale devono essere prelevati nelle stesse ore della giornata. I valori numerici ottenuti dalle analisi delle concentrazioni ormonali differiscono in funzione dei kit disponibili in commercio utilizzati.

Patologia

Necroscopia macroscopica

45. Al momento della soppressione o del decesso durante lo studio va effettuato un esame macroscopico dei soggetti adulti alla ricerca di eventuali anomalie o alterazioni patologiche. Occorre prestare particolare attenzione agli organi dell'apparato riproduttivo e prendere nota del numero dei siti di impianto. Gli strisci vaginali devono essere esaminati al mattino il giorno della necroscopia per determinare lo stadio del ciclo estrale e consentire di stabilire correlazioni con l'istopatologia delle ovaie.

46. Testicoli ed epididimi, come pure l'insieme composto dalla prostata e dalle vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione, di tutti i maschi adulti vanno opportunamente liberati da eventuali tessuti aderenti e pesati umidi immediatamente dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento. Inoltre, si possono pesare facoltativamente altri organi, come l'insieme del muscolo elevatore dell'ano e del muscolo bulbocavernoso, le ghiandole bulbouretrali e il glande nei maschi e le due ovaie (peso a umido) e l'utero (compresa la cervice) nelle femmine; se effettuate, queste misurazioni facoltative devono avvenire subito dopo la dissezione.

47. I piccoli morti o soppressi il tredicesimo giorno dopo il parto, o poco dopo, devono essere sottoposti almeno a un attento esame esterno volto a individuare eventuali anomalie evidenti. Particolare attenzione deve essere dedicata all'apparato riproduttivo esterno, che va esaminato alla ricerca di eventuali alterazioni dello sviluppo. Il tredicesimo giorno bisogna conservare la tiroide di 1 piccolo maschio e di 1 piccolo femmina per nidiata.

48. Le ovaie, i testicoli, gli organi sessuali accessori (utero e cervice, epididimi, prostata, vescicole seminali con ghiandole di coagulazione), la tiroide e tutti gli organi degli animali adulti che presentano lesioni macroscopiche devono essere conservati. La fissazione in formalina è sconsigliata per l'esame di routine di testicoli ed epididimi. Un metodo accettabile per questi tessuti è l'uso del liquido fissativo di Bouin o del liquido fissativo di Davidson modificato (11). La tunica albuginea può essere perforata, con un ago, con delicatezza e superficialmente in entrambi i poli dell'organo per consentire la rapida penetrazione del fissativo.

Esame istopatologico

49. Va eseguito un esame istologico dettagliato di ovaie, testicoli ed epididimi (con particolare attenzione alle fasi della spermatogenesi e dell'istopatologia della struttura delle cellule interstiziali dei testicoli) degli animali del gruppo cui viene somministrata la dose più elevata e del gruppo di controllo. Gli altri organi conservati, compresa la tiroide dei piccoli e degli animali adulti, possono essere esaminati se necessario. Il peso della tiroide può essere stabilito dopo la fissazione. Anche in questo caso l'ablazione deve essere eseguita con cautela e solo previa fissazione per evitare di danneggiare i tessuti. L'eventuale danneggiamento dei tessuti infatti potrebbe compromettere l'analisi istopatologica. Si procede a questi esami anche sugli animali degli altri gruppi trattati se nel gruppo cui viene somministrata la dose più elevata si osservano alterazioni. Il documento di orientamento sull'istopatologia (11) fornisce informazioni supplementari sulla dissezione, la fissazione, l'asportazione e l'istopatologia dei tessuti endocrini.

▼M8

DATI E RELAZIONE

Dati

50. Devono essere forniti dati individuali su ciascun animale. Inoltre, tutti i dati vanno riassunti sotto forma di tabella, evidenziando per ciascun gruppo di studio il numero di animali all'inizio della prova, il numero di animali rinvenuti morti durante la prova o sottoposti a eutanasia, il momento di eventuali decessi o soppressioni, il numero di animali fertili, il numero di femmine gravide, il numero di animali che mostrano segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati, ivi compresi il momento dell'insorgenza, la durata e la gravità degli effetti tossici, i tipi di alterazioni istopatologiche, nonché tutti i dati di rilievo riguardanti le nidiate. Un formato tabulare di relazione sintetica che si è rivelato molto utile per la valutazione degli effetti sulla riproduzione/sullo sviluppo è contenuto nell'appendice 3.

51. Tenuto conto della portata ridotta dello studio, le analisi statistiche sotto forma di prove intese ad accertare la «significatività» dei risultati hanno un valore limitato per molti endpoint, soprattutto quelli riproduttivi. Se si ricorre ad analisi statistiche, il metodo scelto deve essere adatto alla distribuzione della variabile esaminata e selezionato prima di iniziare lo studio. L'analisi statistica dell'AGD e della retrazione del capezzolo deve essere basata sui dati individuali dei piccoli, tenendo conto degli effetti sulle nidiate. Se opportuno, utilizzare la nidiata come unità di analisi. L'analisi statistica del peso corporeo dei piccoli deve essere basata sui dati individuali dei piccoli, tenendo conto delle dimensioni della nidiata. A causa delle dimensioni ridotte del gruppo, può essere utile anche rifarsi ad eventuali dati di controllo storici (ad esempio, per le dimensioni della nidiata) per facilitare l'interpretazione dei dati emersi dallo studio.

Valutazione dei risultati

52. I risultati del presente studio di tossicità vanno valutati in base agli effetti osservati e ai risultati della necroscopia e dell'esame microscopico. La valutazione deve includere il rapporto fra la dose della sostanza chimica in esame e la presenza o l'assenza, l'incidenza e la gravità delle anomalie, comprese eventuali lesioni macroscopiche, gli organi bersaglio identificati, l'infertilità, le anomalie cliniche, la capacità riproduttiva, gli effetti sulla generazione successiva, le alterazioni del peso corporeo, gli effetti sulla mortalità ed eventuali altri effetti tossici.

53. Tenuto conto del breve periodo di trattamento del maschio, l'istopatologia dei testicoli e degli epididimi deve essere considerata insieme ai dati sulla fertilità nel quadro della valutazione degli effetti sulla riproduzione del maschio. Può essere utile anche utilizzare eventuali dati di controllo storici sulla riproduzione/lo sviluppo (ad esempio per le dimensioni della nidiata, l'AGD, la retrazione del capezzolo, i livelli sierici di T4) per facilitare l'interpretazione dello studio.

54. Ai fini del controllo di qualità, si suggerisce di raccogliere dati di controllo storici e di calcolare i coefficienti di variazione per i dati numerici, in particolare per i parametri legati all'individuazione degli interferenti endocrini. Questi dati possono essere utilizzati, a fini di confronto, in fase di valutazione degli studi effettivamente realizzati.

Relazione sull'esecuzione della prova

55. La relazione sull'esecuzione della prova deve comprendere le seguenti informazioni:

Sostanza chimica in esame:

— origine, numero di lotto, data limite per l'uso, se disponibili;

— stabilità della sostanza chimica in esame, se nota;

▼**M8**

Sostanza monocostituente:

— aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;

— dati di identificazione chimica: denominazioni IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale, purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc.;

Sostanza multicostituente, UVCB e miscele:

— caratterizzate nella massima misura possibile con l'identità chimica (cfr. sopra), con la presenza quantitativa e con le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti;

Mezzo disperdente (se del caso):

— giustificazione per la scelta del mezzo disperdente utilizzato, se diverso dall'acqua;

Animali utilizzati nella prova:

— specie/ceppo impiegati;

— numero, età e sesso degli animali;

— origine, condizioni di alloggio, dieta, ecc.;

— peso di ciascun animale all'inizio della prova;

— qualora non siano stati utilizzati ratti, spiegazione del motivo;

Condizioni sperimentali:

— criteri di selezione delle dosi;

— informazioni dettagliate sulla formulazione della sostanza chimica in esame/preparazione della dieta, sulle concentrazioni finali, sulla stabilità e sull'omogeneità del preparato;

— modalità precise di somministrazione della sostanza chimica in esame;

— se del caso, conversione della concentrazione della sostanza nella dieta o nell'acqua (ppm) in dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno);

— dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua;

— descrizione dettagliata del protocollo di randomizzazione utilizzato per selezionare gli eventuali piccoli da sopprimere;

Risultati:

— peso corporeo/cambiamenti del peso corporeo;

— assunzione di cibo ed eventualmente di acqua;

— dati sulla risposta tossica per sesso e per dose, compresi i dati sulla fertilità, la gestazione ed eventuali altri sintomi di tossicità;

— durata della gestazione,

— effetti tossici o di altro tipo sulla riproduzione, sulla prole, sulla crescita postnatale, ecc.;

— natura, gravità e durata dei segni clinici (sia reversibili che non reversibili);

— numero di femmine adulte con ciclo estrale normale o anomalo e durata del ciclo;

— numero di nati vivi e di perdite post-impianto;

— dati relativi al peso corporeo dei piccoli;

— AGD di tutti i piccoli (e peso corporeo il giorno della misurazione dell'AGD);

▼M8

— retrazione del capezzolo nei piccoli di sesso maschile;

— livelli degli ormoni tiroidei, piccoli di 13 giorni e maschi adulti (e madri e piccoli di 4 giorni se sottoposti a misurazione);

— numero di piccoli con anomalie evidenti, valutazione macroscopica degli organi genitali esterni, numero di esemplari più piccoli del normale;

— momento del decesso durante lo studio o indicazione della sopravvivenza degli animali alla conclusione della prova;

— numero di impianti e dimensioni e peso della nidiata al momento della registrazione;

— peso corporeo al momento della soppressione e dati sul peso degli organi negli animali genitori;

— risultati della necroscopia;

— descrizione dettagliata dei risultati istopatologici;

— dati sull'assorbimento (se disponibili);

— elaborazione statistica dei risultati, se del caso.

Discussione dei risultati

Conclusioni

Interpretazione dei risultati

56. Lo studio fornirà valutazioni della tossicità per la riproduzione/lo sviluppo associata alla somministrazione di dosi ripetute (cfr. i paragrafi 5 e 6). Esso può fornire indicazioni sulla necessità di condurre ulteriori indagini e fornisce orientamenti in merito alla progettazione di studi successivi. Si consulti il documento di orientamento n. 43 dell'OCSE per indicazioni sull'interpretazione dei risultati in merito alla riproduzione e allo sviluppo (12). Il documento di orientamento n. 106 dell'OCSE sulla valutazione istologica delle prove endocrine e sulla riproduzione nei roditori (11) fornisce informazioni sulla preparazione e la valutazione degli organi (endocrini) e degli strisci vaginali che possono essere utili per questa linea guida.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic and Cooperation and Development, Paris.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Available Upon Request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(4) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(5) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

(6) OECD (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment(No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

(8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L.(1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(10) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(11) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No106), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(12) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Appendice 1

DEFINIZIONI (CFR. ANCHE LA LINEA GUIDA N. 150 DELL'OCSE (6))

Androgenicità: la capacità di una sostanza chimica di agire come un ormone androgenico naturale (ad es. il testosterone) in un mammifero.

Antiandrogenicità: la capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività di un ormone androgenico naturale (ad es. il testosterone) in un mammifero.

Antiestrogenicità: la capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività di un ormone estrogenico naturale (ad es. l'estradiolo 17ß) in un mammifero.

Attività antitiroidea: la capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività di un ormone tiroideo naturale (ad es. $T_{3)}$ in un mammifero.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Tossicità per lo sviluppo: la manifestazione della tossicità per la riproduzione, che risulta in disturbi prenatali, perinatali, postnatali, strutturali o funzionali nella progenie.

Dosaggio: termine generale che ricomprende la dose, la frequenza e la durata della somministrazione.

Dose: quantità di sostanza chimica somministrata. La dose è espressa come peso della sostanza chimica in esame per unità di peso corporeo dell'animale utilizzato nella prova per giorno (mg/kg peso corporeo/giorno) o come una concentrazione costante nella dieta.

Tossicità evidente: termine generale che designa i segnali evidenti di tossicità a seguito della somministrazione di una sostanza chimica. Questi segni devono essere sufficienti per consentire la valutazione dei pericoli ed essere tali che si possa prevedere che l'aumento della dose somministrata comporti la comparsa di segni di tossicità grave e probabilmente la mortalità.

Compromissione della fertilità: i disturbi delle funzioni o della capacità riproduttive maschili o femminili.

Tossicità materna: gli effetti nocivi sulle femmine gravide, che si verificano in modo specifico (effetto diretto) o non specifico (effetto indiretto).

NOAEL: l'abbreviazione di *no-observed-adverse-effect level*, ossia la dose più elevata alla quale non si osservano effetti avversi legati al trattamento.

Estrogenicità: la capacità di una sostanza chimica di agire come un ormone estrogenico naturale (ad es. l'estradiolo 17ß) in un mammifero.

Tossicità della riproduzione: gli effetti nocivi sulla progenie e/o la compromissione delle funzioni o della capacità riproduttive maschili e femminili.

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

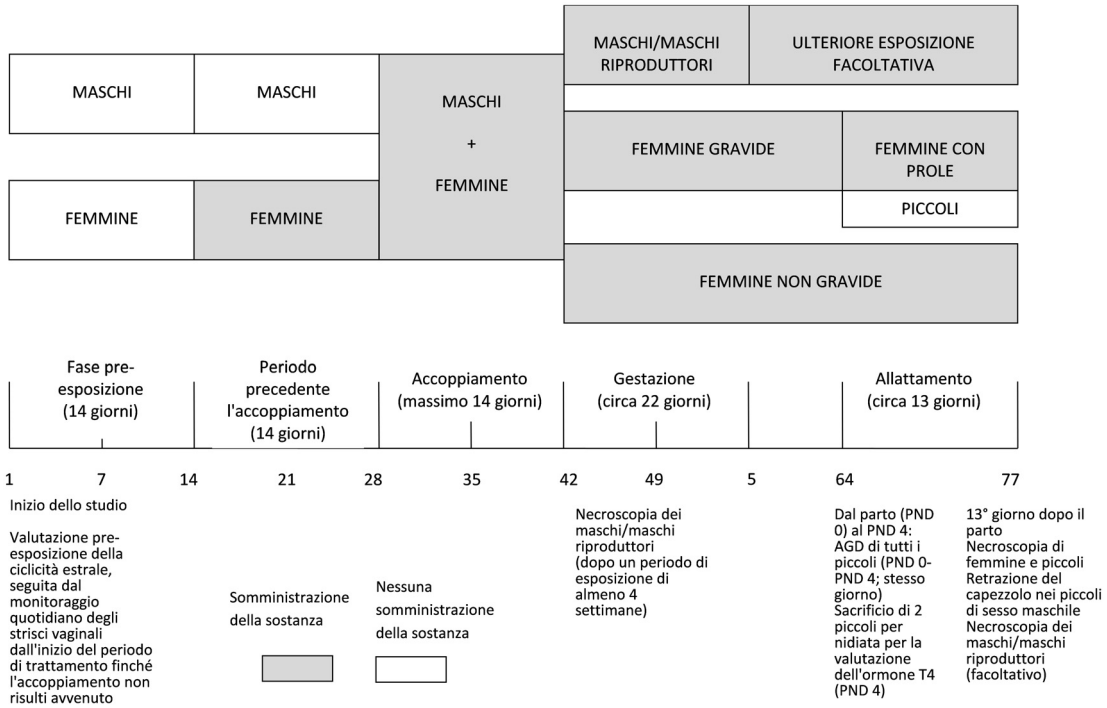
Attività tiroidea: la capacità di una sostanza chimica di agire come un ormone tiroideo naturale (ad es. $T_{3)}$ in un mammifero.

Validazione: processo scientifico destinato a caratterizzare i requisiti e i limiti operativi di un metodo di prova e a dimostrarne l'affidabilità e la pertinenza per un fine specifico.

▼**M8**

Appendice 2

DIAGRAMMA DEL PROTOCOLLO SPERIMENTALE INDICANTE LA DURATA MASSIMA DELLO STUDIO, BASATO SU UN PERIODO DI ACCOPPIAMENTO COMPLETO DI 14 GIORNI



▼**M8**

Appendice 3

RELAZIONE SINTETICA IN FORMATO TABULARE DEGLI EFFETTI SULLA RIPRODUZIONE/SULLO SVILUPPO

OSSERVAZIONI	VALORI				
Dosaggio (unità)	0 (controllo)	...	...	...	...
Coppie formate (N)					
Ciclo estrale (almeno durata media e frequenza dei cicli irregolari)					
Femmine per le quali la copulazione risulta avvenuta (N)					
Femmine gravide (N)					
Giorni di concepimento 1 - 5 (N)					
Giorni di concepimento 6 -...([1]) (N)					
Gravidanza ≤ 21 giorni (N)					
Gravidanza = 22 giorni (N)					
Gravidanza ≥ 23 giorni (N)					
Madri che hanno partorito piccoli vivi (N)					
Madri con piccoli vivi il quarto giorno dopo il parto (N)					
Impianti/madre (media)					
Piccoli vivi/madre alla nascita (media)					
Piccoli vivi/madre al quarto giorno (media)					
Rapporto numerico tra i sessi (m/f) alla nascita (media)					
Rapporto numerico tra i sessi (m/f) al quarto giorno (media)					
Peso della nidiata alla nascita (media)					
Peso della nidiata al quarto giorno (media)					
Peso dei piccoli alla nascita (media)					
Peso dei piccoli al momento della misurazione dell'AGD (media maschi, media femmine)					

▼**M8**

OSSERVAZIONI	VALORI				
Dosaggio (unità)	0 (controllo)	...	...	...	...
AGD dei piccoli misurata lo stesso giorno dalla nascita, tra la nascita e il giorno 4 (media maschi, media femmine, prendere nota del PND)					
Peso dei piccoli al quarto giorno (media)					
Retrazione del capezzolo dei piccoli maschi al tredicesimo giorno (media)					
Peso dei piccoli al tredicesimo giorno (media)					
PICCOLI CON ANOMALIE					
Madri con 0					
Madri con 1					
Madri con ≥ 2					
PERDITA DELLA PROGENIE					
Perdite prenatali/dopo l'impianto (impianti meno piccoli nati vivi)					
Femmine con 0					
Femmine con 1					
Femmine con 2					
Femmine con ≥ 3					
Perdite postnatali (piccoli nati vivi meno piccoli vivi il tredicesimo giorno dopo il parto)					
Femmine con 0					
Femmine con 1					
Femmine con 2					
Femmine con ≥ 3					

([1]) Ultimo giorno del periodo di accoppiamento

▼M8

B.64. STUDIO DI TOSSICITÀ CON DOSE RIPETUTA COMBINATO CON LA PROVA DI SCREENING DELLA TOSSICITÀ PER LA RIPRODUZIONE/LO SVILUPPO

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida n. 422 dell'OCSE (2016). Le linee guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche sono periodicamente rivedute e aggiornate alla luce del progresso scientifico. La linea guida n. 422 sulla prova di screening è stata adottata inizialmente nel 1996, sulla base di un protocollo per una «prova di screening della tossicità con dose ripetuta combinata con una prova di screening della tossicità per la riproduzione e lo sviluppo» di cui si è discusso nell'ambito di due riunioni di esperti, a Londra nel 1990 (1) e a Tokyo nel 1992 (2).

2. Il presente metodo di prova consta di una parte in cui è effettuato uno screening della tossicità per la riproduzione/lo sviluppo, basata sull'esperienza acquisita negli Stati membri attraverso l'utilizzo del metodo originario con le sostanze chimiche esistenti a elevato volume di produzione e la conduzione di prove esplorative con sostanze utilizzate come controllo positivo (3) (4), e di una parte in cui viene esaminata la tossicità mediante prove con dosi ripetute, conformemente alla linea guida per le prove n. 407 dell'OCSE (studio della tossicità orale con somministrazione ripetuta di dosi per 28 giorni sui roditori, corrispondente al capitolo B.7 del presente allegato).

3. Il presente metodo di prova è stato aggiornato mediante l'aggiunta di endpoint pertinenti per il rilevamento di interferenti endocrini, come seguito all'attività ad alta priorità avviata dall'OCSE nel 1998 volta a rivedere le linee guida esistenti e a elaborarne di nuove, per lo screening e la sperimentazione relativi a potenziali interferenti endocrini (5). In tale contesto, la linea guida n. 407 dell'OCSE (che corrisponde al capitolo B.7 del presente allegato) è stata migliorata nel 2008 mediante l'aggiunta di parametri adatti per l'individuazione dell'attività endocrina delle sostanze chimiche in esame. La linea guida n. 422 è stata aggiornata con l'intento di includere gli endpoint pertinenti per il rilevamento di interferenti endocrini nelle linee guida in cui i periodi di esposizione coprono alcuni dei periodi sensibili dello sviluppo (i periodi precedenti o immediatamente successivi alla nascita).

4. Gli ulteriori endpoint pertinenti per il rilevamento di interferenti endocrini selezionati, che fanno parte anche della linea guida n. 443 (studio esteso di tossicità per la riproduzione su una generazione, corrispondente al capitolo B.56 del presente allegato), sono stati aggiunti alla linea guida n. 422 sulla base di uno studio di fattibilità riguardante questioni scientifiche e tecniche relative alla loro inclusione, come pure gli eventuali adattamenti del disegno sperimentale necessari per la loro inclusione (6).

5. Il presente metodo di prova è inteso a generare informazioni limitate concernenti gli effetti delle sostanze chimiche in esame sulla capacità riproduttiva maschile e femminile, quali la funzione delle gonadi, il comportamento in fase di accoppiamento, il concepimento, lo sviluppo dell'organismo concepito e il parto. Esso non rappresenta un'alternativa ai metodi di prova esistenti B.31, B.34, B.35 e B.56, né li sostituisce.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

6. Nella valutazione e nell'esame delle caratteristiche tossiche di una sostanza chimica è possibile determinare la tossicità orale utilizzando dosi ripetute dopo aver ottenuto dati preliminari sulla tossicità mediante prove di tossicità acuta. Il presente studio fornisce informazioni sui rischi che l'esposizione ripetuta per un periodo di tempo relativamente limitato può comportare per la salute. Il metodo prevede uno studio di base della tossicità a dosi ripetute che può essere utilizzato per le sostanze chimiche per le quali uno studio di 90 giorni non si giustifica (ad esempio quando il volume di produzione non supera determinate quantità) o prima di uno studio a lungo termine. Durante lo svolgimento dello studio è opportuno seguire i principi guida e le considerazioni di cui al documento di orientamento dell'OCSE n. 19, *Recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* (7).

▼M8

7. Esso comprende inoltre una prova di screening della tossicità per la riproduzione/lo sviluppo e, pertanto, può essere utilizzato anche per fornire informazioni iniziali sui possibili effetti sulla capacità riproduttiva maschile e femminile, quali la funzione delle gonadi, il comportamento in fase di accoppiamento, il concepimento, lo sviluppo dell'organismo concepito e il parto, nella fase iniziale di valutazione delle proprietà tossicologiche delle sostanze chimiche o nella valutazione di sostanze potenzialmente pericolose. Il presente metodo di prova non fornisce informazioni complete su tutti gli aspetti della riproduzione e dello sviluppo. In particolare, esso offre solo mezzi limitati per individuare manifestazioni postnatali di un'esposizione prenatale o effetti eventualmente riconducibili a un'esposizione postnatale. Tenuto conto (tra le altre cose) della selettività degli endpoint e della breve durata dello studio, il presente metodo non fornisce prove sufficienti per trarre conclusioni definitive circa l'assenza di effetti sulla riproduzione o lo sviluppo. Inoltre, in assenza di dati desunti da altre prove di tossicità per la riproduzione/lo sviluppo, risultati positivi sono utili per una valutazione iniziale dei pericoli e permettono di prendere decisioni circa la necessità di procedere a ulteriori prove e i tempi per effettuarle.

8. I risultati ottenuti per quanto riguarda i parametri endocrini devono essere interpretati alla luce del «Quadro concettuale dell'OCSE per le prove e la valutazione delle sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino» (8). La linea guida migliorata dell'OCSE n. 422 fa parte del livello 4 di questo quadro concettuale come saggio *in vivo* in grado di fornire dati sugli effetti nocivi sugli endpoint pertinenti per il sistema endocrino. Un segnale endocrino potrebbe tuttavia non essere considerato di per sé una prova sufficiente ad attestare che la sostanza chimica in esame è un interferente endocrino.

9. Il presente metodo di prova attribuisce inoltre particolare importanza agli effetti neurologici in quanto parametro specifico di valutazione e comporta la necessità di un'accurata osservazione clinica degli animali per ottenere il maggior numero possibile di informazioni. Tale metodo è finalizzato all'individuazione di sostanze chimiche dotate di un potenziale neurotossico, che potranno successivamente richiedere indagini più approfondite al riguardo. Inoltre, il metodo può fornire anche un'indicazione di base degli effetti immunologici.

10. In assenza di dati desunti da altri studi sulla tossicità sistemica, la tossicità per la riproduzione/lo sviluppo, la neurotossicità e/o l'immunotossicità, risultati positivi sono utili per una valutazione iniziale dei pericoli e permettono di prendere decisioni circa la necessità di procedere a ulteriori prove e i tempi per effettuarle. La prova può essere particolarmente utile nell'ambito delle serie di dati di informazione di monitoraggio dell'OCSE per la valutazione delle sostanze chimiche esistenti per le quali le informazioni tossicologiche sono scarse o inesistenti e può essere utilizzata come alternativa alla conduzione di due prove distinte, rispettivamente per la tossicità a dosi ripetute (linea guida n. 407 dell'OCSE, corrispondente al capitolo B.7 del presente allegato) e la tossicità per la riproduzione/lo sviluppo (linea guida n. 421 dell'OCSE, corrispondente al capitolo B.63 del presente allegato). Può essere utilizzata anche come studio di determinazione degli intervalli di dosaggio per studi più approfonditi sulla riproduzione o sullo sviluppo o in altri casi in cui sia ritenuto opportuno.

11. In genere, si presuppone che vi siano differenze a livello di sensibilità tra le femmine gravide e quelle non gravide. Di conseguenza, rispetto alla conduzione di prove distinte, in questa prova combinata può essere più complicato determinare i livelli di dosaggio adeguati per valutare sia la tossicità sistemica generale sia la tossicità specifica per la riproduzione/lo sviluppo. Inoltre, rispetto alla conduzione di uno studio a dosi ripetute, l'interpretazione dei risultati della prova per quanto riguarda la tossicità sistemica generale può essere più difficile, soprattutto quando i parametri sierici e istopatologici non sono valutati contemporaneamente nello studio. A causa di queste complessità tecniche, per eseguire

▼M8

questa prova di screening combinata è richiesta molta esperienza nella conduzione di prove di tossicità. Dall'altro lato, oltre a coinvolgere un numero inferiore di animali, la prova combinata può consentire di distinguere meglio gli effetti diretti sulla riproduzione/lo sviluppo da quelli secondari rispetto ad altri effetti (sistemici).

12. Il periodo di esposizione di questa prova è più lungo rispetto a quello di un convenzionale studio a dosi ripetute di 28 giorni. Tuttavia, il numero di animali di ciascun sesso per gruppo è inferiore a quello utilizzato nel caso di un convenzionale studio a dosi ripetute di 28 giorni condotto in aggiunta a una prova di screening della tossicità per la riproduzione/lo sviluppo.

13. Il presente metodo di prova prevede la somministrazione orale della sostanza chimica da esaminare. Potrebbero essere necessarie modifiche in caso di utilizzo di altre vie di somministrazione.

14. Prima di applicare il presente metodo di prova a una miscela per generare dati ai fini regolamentari previsti, si deve considerare se, e in caso affermativo, perché, esso possa fornire risultati adeguati a tale scopo. Tali considerazioni non sono necessarie laddove esista una disposizione normativa che obblighi a sottoporre a prova la miscela.

15. L'appendice 1 contiene le definizioni dei termini utilizzati.

PRINCIPIO DELLA PROVA

16. La sostanza chimica in esame viene somministrata in dosi graduate a diversi gruppi di maschi e femmine. Ai maschi le dosi devono essere somministrate per almeno quattro settimane e fino al giorno precedente alla soppressione programmata, compreso tale giorno (tale periodo comprende un minimo di due settimane prima dell'accoppiamento, il tempo dell'accoppiamento e circa due settimane dopo l'accoppiamento). Tenuto conto della breve durata del periodo di esposizione prima dell'accoppiamento nei maschi, la fertilità potrebbe non essere un particolare indicatore di sensibilità per la tossicità testicolare. È pertanto essenziale un esame istologico particolareggiato delle prove. La combinazione di un periodo di esposizione di due settimane prima dell'accoppiamento (seguito da osservazioni sull'accoppiamento e la fertilità) e di un periodo di esposizione complessivo di almeno quattro settimane (seguito da un dettagliato esame istopatologico delle gonadi maschili) è considerata sufficiente a consentire l'individuazione della maggior parte degli effetti sulla fertilità maschile e sulla spermatogenesi.

17. Alle femmine la sostanza va somministrata durante l'intero studio. Tale periodo comprende due settimane prima dell'accoppiamento (con l'obiettivo di coprire almeno due cicli estrali completi), l'intervallo variabile che precede il concepimento, la durata della gestazione e almeno tredici giorni dopo il parto, fino al giorno precedente alla soppressione programmata, compreso tale giorno.

18. La durata dello studio, dopo l'acclimatazione e la valutazione del ciclo estrale precedente la somministrazione, dipende dal comportamento della femmina ed è di circa 63 giorni [almeno 14 giorni prima dell'accoppiamento, un massimo di 14 giorni per l'accoppiamento, 22 giorni di gestazione, 13 giorni di allattamento].

19. Durante il periodo di somministrazione gli animali vengono esaminati attentamente e quotidianamente al fine di rilevare eventuali segni di tossicità. Gli animali deceduti o soppressi durante l'esperimento vengono sottoposti a necroscopia; al termine della prova gli animali superstiti vengono soppressi e sottoposti a necroscopia.

▼M8

DESCRIZIONE DEL METODO

Selezione della specie animale

20. Il presente metodo di prova è destinato ad essere utilizzato con i ratti. Se i parametri specificati nella presente linea guida n. 422 sono studiati in un'altra specie di roditori occorre fornire una giustificazione dettagliata. Nel programma internazionale di validazione per l'individuazione degli interferenti endocrini nella linea guida n. 407 il ratto è stata l'unica specie animale utilizzata. Non vanno usati ceppi a bassa fecondità o con nota elevata incidenza di difetti dello sviluppo. Si devono utilizzare animali vergini sani, non sottoposti in precedenza a esperimenti. Gli animali utilizzati nella prova devono essere caratterizzati quanto alle specie, al ceppo, al sesso, al peso e all'età. All'inizio dello studio la variazione ponderale degli animali utilizzati deve essere minima e non superare il 20 % circa del peso medio di ciascun sesso. Per gli studi preliminari a studi a lungo termine o effettuati su un'intera generazione, è preferibile ricorrere in entrambi gli studi ad animali dello stesso ceppo e della stessa provenienza.

Condizioni di stabulazione e alimentazione

21. Tutte le procedure devono attenersi agli standard locali in materia di cura degli animali da esperimento. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve essere non inferiore al 30 % e, preferibilmente, non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale, con un fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata di acqua da bere. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di garantire un'adeguata miscela della sostanza chimica in esame, se quest'ultima è somministrata con il cibo.

22. Gli animali devono essere sistemati nelle gabbie in piccoli gruppi dello stesso sesso; possono essere sistemati in gabbie individuali se necessario per ragioni scientifiche. Ciascuna gabbia non deve ospitare più di cinque animali. L'accoppiamento va effettuato in gabbie adeguate allo scopo. Le femmine gravide devono essere tenute in gabbie individuali e rifornite di materiale per la costruzione della tana. Le femmine che allattano vanno poste in gabbie individuali insieme alla prole.

23. L'alimentazione deve essere analizzata periodicamente per verificare la presenza di contaminanti. Un campione del mangime somministrato deve essere conservato fino al completamento della relazione.

Preparazione degli animali

24. Vengono scelti a caso soggetti giovani adulti destinati ai gruppi di trattamento e alle gabbie. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Gli animali vanno identificati inequivocabilmente e acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno cinque giorni prima dell'inizio dello studio.

Preparazione delle dosi

25. Si raccomanda di somministrare la sostanza chimica in esame per via orale, a meno che non si considerino più appropriate altre vie di somministrazione. Se si sceglie la via orale, la sostanza chimica è generalmente somministrata mediante sonda gastrica; tuttavia, in alternativa, può essere somministrata anche con la dieta o l'acqua da bere.

26. Ove necessario, la sostanza in esame è disciolta o sospesa in un mezzo disperdente adeguato. Si raccomanda di prendere anzitutto in considerazione, ogni qualvolta possibile, l'uso di una soluzione/sospensione acquosa, e in seconda battuta quello di una soluzione/sospensione in olio (ad esempio olio di semi di mais) e infine la possibile soluzione in altri mezzi disperdenti. Le caratteristiche tossiche dei mezzi disperdenti non acquosi devono essere note. È necessario determinare la stabilità e l'omogeneità della sostanza chimica in esame nel mezzo disperdente.

▼M8

PROCEDURA

Numero e sesso degli animali

27. Si raccomanda di costituire gruppi di almeno 10 maschi e 12-13 femmine. Nella fase pre-esposizione si procede alla valutazione della ciclicità estrale nelle femmine e gli animali che non presentano un ciclo tipico di 4-5 giorni non sono inclusi nello studio; si raccomanda pertanto di utilizzare un numero supplementare di femmine per ottenere 10 femmine per ciascun gruppo. Eccetto i casi in cui gli effetti tossici sono notevoli, si dovrebbero ottenere per ciascun gruppo almeno 8 femmine gravide, che generalmente è il numero minimo accettabile. Lo scopo è ottenere un numero di gravidanze e nidiate che consenta una valutazione significativa del potenziale della sostanza chimica in esame di influire negativamente sulla fertilità, sulla gravidanza, sul comportamento materno, sulla suzione, sulla crescita e sullo sviluppo della progenie F_1, dal concepimento al tredicesimo giorno dopo il parto. Qualora si preveda di sacrificare a intervalli intermedi alcuni animali, il numero va aumentato del numero di animali che si prevede di sacrificare prima del completamento dello studio. Si può considerare di includere un gruppo satellite supplementare di cinque animali (5 per sesso) nel gruppo di controllo e nel gruppo trattato con la dose più elevata al fine di monitorare la reversibilità, la persistenza o l'insorgenza ritardata di effetti tossici sistemici, per almeno 14 giorni dopo il trattamento. Gli animali del gruppo satellite non vengono fatti accoppiare e, di conseguenza, non sono utilizzati ai fini della valutazione della tossicità per la riproduzione/lo sviluppo.

Dosaggio

28. Si utilizzano generalmente almeno tre gruppi da trattare e un gruppo di controllo. Per stabilire le dosi da utilizzare, in mancanza di dati adeguati relativi alla tossicità in generale si può effettuare uno studio preliminare di tipo *range finding*. Fatta eccezione per la somministrazione della sostanza chimica in esame, gli animali del gruppo di controllo devono essere trattati in modo identico agli esemplari dei gruppi sottoposti al trattamento. Se si usa un mezzo disperdente per la somministrazione della sostanza chimica in esame, al gruppo di controllo verrà somministrato il medesimo mezzo disperdente nel volume massimo utilizzato.

29. I livelli di dosaggio devono essere selezionati tenendo conto di tutti i dati disponibili sulla tossicità e le caratteristiche (tossico-)cinetiche. Bisogna inoltre tener conto del fatto che potrebbero esserci differenze di sensibilità tra le femmine gravide e quelle non gravide. Il livello massimo di dosaggio deve essere tale da indurre effetti tossici senza cagionare la morte o sofferenze gravi. Sarà inoltre definita una serie decrescente di dosaggi al fine di individuare eventuali risposte a dosi determinate e dimostrare l'assenza di effetti avversi al dosaggio minimo. Per la determinazione dei livelli di dose decrescenti risulta spesso ottimale applicare un fattore di divisione compreso tra due e quattro; è comunque preferibile aggiungere un quarto gruppo di studio piuttosto che avere uno scarto eccessivo (ad esempio superiore a un fattore 10) tra un dosaggio e l'altro.

30. Nel caso di tossicità generale osservata (ad es. riduzione del peso corporeo, effetti a livello epatico, cardiaco, polmonare o renale ecc.) o di altri cambiamenti che potrebbero non essere dovuti ad effetti tossici (ad es. diminuzione dell'assunzione di alimenti, dilatazione del fegato), gli effetti rilevati sugli endpoint endocrini devono essere interpretati con cautela.

Prova limite

31. Qualora uno studio orale, effettuato in conformità con il metodo descritto, con un livello di dosaggio di almeno 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno o, in caso di somministrazione con gli alimenti o l'acqua, ad una concentrazione equivalente (in funzione del peso corporeo), non produca effetti tossici osservabili e se i dati relativi a sostanze di struttura analoga non indicano tossicità, si può ritenere non necessario uno studio completo con diversi

▼M8

dosaggi. La prova limite va effettuata, tranne quando i dati sull'esposizione umana indicano la necessità di utilizzare un livello di dosaggio più elevato. Per altri tipi di somministrazione, ad esempio per inalazione o applicazione cutanea, il livello massimo di esposizione realizzabile dipende in molti casi dalle proprietà fisico-chimiche delle sostanze chimiche da esaminare.

Somministrazione delle dosi

32. Agli animali viene somministrata una dose giornaliera della sostanza chimica in esame sette giorni alla settimana. Se viene effettuata per via intragastrica, la somministrazione deve avvenire in dose singola mediante sonda gastrica o idonea cannula per intubazione. Il volume massimo di liquido che può essere somministrato in una sola volta dipende dalla taglia dell'animale. Il volume non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo, tranne nel caso delle soluzioni acquose che possono essere somministrate in quantità pari a 2 ml/100 g di peso corporeo. Salvo nel caso di sostanze chimiche irritanti o corrosive, i cui effetti di norma tendono a esacerbarsi con l'aumentare della concentrazione, la variabilità del volume somministrato deve essere ridotta al minimo adeguando la concentrazione, in modo da mantenere un volume costante per tutti i livelli di dosaggio.

33. Per le sostanze chimiche somministrate con la dieta o l'acqua da bere è importante impedire che la quantità della sostanza chimica in esame interferisca con la normale alimentazione o il normale bilancio dei liquidi. Se la sostanza chimica in esame è somministrata con la dieta, si può utilizzare una concentrazione costante nella dieta (ppm) o un livello di dosaggio costante in funzione del peso corporeo di ciascun animale; la scelta di eventuali alternative va specificata. Nel caso di sostanze chimiche somministrate mediante sonda gastrica, la dose va somministrata ogni giorno all'incirca agli stessi orari e regolata almeno settimanalmente per mantenere un livello costante delle dosi rispetto al peso corporeo degli animali. Se lo studio combinato è preliminare a uno studio sulla tossicità a lungo termine o a uno studio effettuato su un'intera generazione, occorre utilizzare una dieta simile in entrambi gli studi.

Protocollo sperimentale

34. La somministrazione della sostanza a entrambi i sessi deve iniziare due settimane prima dell'accoppiamento, dopo un periodo di acclimatazione di almeno cinque giorni e dopo avere osservato nelle femmine un ciclo estrale normale (durante un periodo di pre-trattamento di 2 settimane). Lo studio deve essere programmato in modo tale che la valutazione del ciclo estrale inizi subito dopo il raggiungimento della maturità sessuale completa da parte degli animali. Ciò può variare leggermente a seconda dei ceppi di ratti e dei laboratori, ad esempio 10 settimane per i ratti Sprague Dawley e circa 12 settimane per i ratti Wistar. Le femmine con prole devono essere soppresse il tredicesimo giorno dopo il parto o poco dopo. Per consentire il digiuno notturno delle madri prima del prelievo di sangue (se si preferisce tale opzione), non è necessario sopprimere le madri e la loro progenie lo stesso giorno. Il giorno della nascita (ossia quello in cui viene completato il parto) è il giorno 0 post-parto. Le femmine per le quali non vi sono prove di avvenuta copulazione sono soppresse 24-26 giorni dopo l'ultimo giorno del periodo di accoppiamento. La somministrazione della sostanza va continuata, in entrambi i sessi, durante il periodo di accoppiamento. Dopo tale periodo, la somministrazione deve proseguire per i maschi almeno fino al completamento del periodo di dosaggio totale minimo di 28 giorni. I maschi sono in seguito soppressi o mantenuti in vita e continuano a ricevere la sostanza in esame ai fini di un eventuale secondo accoppiamento, ove ritenuto opportuno.

35. La somministrazione giornaliera delle dosi alle femmine riproduttrici va continuata per tutta la gravidanza e almeno fino al tredicesimo giorno dopo il parto o al giorno prima della soppressione incluso. Per gli studi in cui la sostanza chimica in esame è somministrata tramite inalazione o per via cutanea, la somministrazione deve proseguire almeno fino al diciannovesimo giorno di gestazione incluso e deve essere iniziata di nuovo appena possibile e comunque entro il quarto giorno dalla nascita (PND 4).

▼M8

36. Gli animali del gruppo satellite destinati al monitoraggio di follow-up, se inclusi, non vengono fatti accoppiare. Essi devono essere esaminati per almeno altri 14 giorni dopo la prima soppressione pianificata delle madri, senza alcun trattamento, al fine di individuare l'insorgenza tardiva, la persistenza o la scomparsa degli effetti tossici.

37. Un diagramma del calendario della prova è contenuto nell'appendice 2.

Cicli estrali

38. I cicli estrali devono essere monitorati prima dell'inizio del trattamento per selezionare per lo studio femmine aventi una ciclicità regolare (cfr. il paragrafo 27). Vanno monitorati anche gli strisci vaginali, ogni giorno dall'inizio del periodo di trattamento finché l'accoppiamento non risulti avvenuto. Se vi è il sospetto che effetti legati a forte stress all'inizio del trattamento possano alterare i cicli estrali, i laboratori possono esporre gli animali utilizzati nella prova per due settimane e quindi effettuare ogni giorno strisci vaginali per monitorare il ciclo estrale per almeno due settimane iniziando nel periodo precedente l'accoppiamento e proseguendo durante il periodo dell'accoppiamento finché quest'ultimo non risulti effettuato. Durante il prelievo delle cellule vaginali/cervicali occorre prestare attenzione a non ledere la mucosa per evitare un'eventuale induzione di pseudogravidanza (8) (9).

Procedura di accoppiamento

39. Nel presente studio si utilizza normalmente il sistema di accoppiamento 1:1 (un maschio per una femmina). Possono essere previste eccezioni in caso di morte occasionale di esemplari maschi. Si deve mettere una femmina con lo stesso maschio fino a quando la copulazione è comprovata o sono trascorse due settimane. Ogni mattina le femmine devono essere esaminate per verificare la presenza di sperma o di tappi vaginali. Il giorno 0 della gravidanza è definito come il giorno in cui si riscontra la prova dell'avvenuta copulazione (presenza di un tappo vaginale o di sperma). Nel caso in cui l'accoppiamento non abbia successo, si può valutare la possibilità di far accoppiare le femmine con maschi di comprovata capacità riproduttiva dello stesso gruppo.

Dimensioni della nidiata

40. Il quarto giorno dopo la nascita è possibile uniformare le dimensioni di ogni nidiata eliminando i piccoli in eccesso tramite selezione casuale, in modo da ottenere, nella misura del possibile, quattro o cinque piccoli per sesso per ciascuna nidiata, a seconda delle dimensioni normali della nidiata nei ceppi di ratti utilizzati. I campioni di sangue devono essere prelevati da due dei piccoli in eccedenza, raggruppati e utilizzati per determinare i livelli sierici di T4. L'eliminazione selettiva dei piccoli, ad esempio in base al peso corporeo o alla distanza anogenitale (AGD), non è opportuna. Ogni volta che il numero di piccoli maschi o femmine non permette di avere quattro o cinque animali di ciascun sesso per nidiata, è accettabile una regolazione parziale (ad esempio, sei maschi e quattro femmine). Se le dimensioni della nidiata scendono al di sotto della soglia di uniformazione (8 o 10 piccoli per ciascuna nidiata), nessun piccolo sarà eliminato. Qualora vi sia un solo piccolo al di sopra della soglia di uniformazione, esso sarà eliminato e utilizzato per prelevare il campione di sangue ai fini della determinazione dei livelli sierici di T4.

41. Se le dimensioni della nidiata non sono uniformate, si sacrificano due piccoli per nidiata il quarto giorno dopo la nascita e si prelevano campioni di sangue per valutare la concentrazione sierica degli ormoni tiroidei. Se possibile, nel selezionare i due piccoli per nidiata da sacrificare, scegliere due femmine per tenere da parte i maschi per la valutazione della retrazione del capezzolo, tranne nel caso in cui l'eliminazione di questi piccoli non lasci alcuna femmina per le valutazioni da effettuare al termine. Non bisogna eliminare alcun piccolo se vi sono meno di 8 o 10 piccoli per nidiata (a seconda delle dimensioni normali della nidiata nei ceppi di ratti utilizzati). Qualora vi sia un solo piccolo in più rispetto alle dimensioni normali della nidiata, un solo piccolo sarà eliminato e utilizzato per prelevare il campione di sangue ai fini della determinazione dei livelli sierici di T4.

▼M8

Osservazioni

42. Le osservazioni cliniche generali devono essere effettuate almeno una volta al giorno, preferibilmente alla stessa ora e tenendo conto del periodo di massima intensità degli effetti previsti dopo la somministrazione. Vanno registrate le informazioni concernenti le condizioni di salute degli animali. Almeno due volte al giorno, tutti gli animali vengono esaminati al fine di determinare la morbilità e la mortalità.

43. Una volta prima dell'esposizione iniziale (per consentire un confronto sullo stesso soggetto) e, successivamente, almeno una volta alla settimana tutti gli animali genitori vengono sottoposti ad osservazioni cliniche particolareggiate. A tale scopo gli animali vengono tolti dalle gabbie, collocati in un recinto standard ed esaminati di preferenza sempre alla stessa ora, ogni giorno. Occorre registrare con cura le osservazioni, preferibilmente usando sistemi di punteggio statistico definiti appositamente dal laboratorio che esegue la prova. Si avrà cura di ridurre al minimo le variazioni delle condizioni sperimentali; le osservazioni devono essere effettuate da persone che non sono a conoscenza del trattamento somministrato. Si terrà conto, tra l'altro, di tutte le alterazioni della cute, del pelo, degli occhi, delle mucose, della comparsa di secrezioni ed escrezioni e dell'attività neurovegetativa (per esempio lacrimazione, piloerezione, ampiezza pupillare, ritmo respiratorio insolito). Vanno inoltre registrati cambiamenti dell'andatura, della postura e della risposta alla manipolazione, nonché la presenza di movimenti clonici o tonici, stereotipie (ad esempio tolettatura eccessiva, continuo girare in cerchio), parto difficoltoso o prolungato o comportamenti insoliti (ad esempio automutilazione, marcia a ritroso) (10).

44. Ad un certo punto durante lo studio, devono essere svolte valutazioni della reattività sensoriale a stimoli di vario tipo (ad esempio stimoli uditivi, visivi e propriocettivi) (8) (9) (11), della forza di presa (12) e dell'attività motoria (13) per cinque maschi e cinque femmine, selezionati da ciascun gruppo secondo un criterio di casualità. Ulteriori indicazioni sui procedimenti utilizzabili sono contenute nelle voci bibliografiche citate. Tuttavia possono essere applicate anche procedure alternative non indicate nella bibliografia. Nei maschi queste osservazioni funzionali devono essere effettuate verso la fine del periodo di esposizione, poco prima della soppressione programmata ma prima del prelievo dei campioni di sangue per gli esami ematologici o gli esami biochimici clinici (cfr. i paragrafi 53-56, compresa la nota a piè di pagina 1). La prova sulle femmine, che devono trovarsi in uno stato fisiologico simile durante queste prove funzionali, deve essere effettuata di preferenza una sola volta nell'ultima settimana di allattamento (ad esempio, il sesto-tredicesimo giorno di allattamento), poco prima della soppressione programmata. Nella misura del possibile, ridurre i tempi di separazione delle madri e dei piccoli.

45. Le osservazioni funzionali effettuate una volta verso la fine dello studio possono essere evitate nel caso di uno studio preliminare ad un successivo studio subcronico (90 giorni) o ad un successivo studio a lungo termine. In questa eventualità, le osservazioni funzionali devono essere incluse nello studio complementare. D'altro canto, le informazioni ricavate dalle osservazioni funzionali nel corso dello studio a dosi ripetute possono essere utili nella determinazione dei livelli di dosaggio per un successivo studio subcronico o a lungo termine.

46. Eccezionalmente è possibile omettere le osservazioni funzionali per i gruppi che evidenzino comunque segni di tossicità tali da interferire in modo significativo con l'esecuzione degli esami funzionali.

47. La durata della gestazione deve essere registrata e calcolata dal giorno 0 di gravidanza. Ogni nidiata deve essere esaminata non appena possibile dopo il parto per stabilire il numero e il sesso dei piccoli, dei nati morti, dei nati vivi e degli esemplari più piccoli del normale (i piccoli molto più piccoli dei piccoli di controllo) e la presenza di grosse anomalie.

▼M8

48. Si procede a contare e identificare il sesso dei piccoli vivi e a pesare le nidiate entro 24 ore dal parto (giorno 0 o 1 dopo il parto) e almeno il quarto e il tredicesimo giorno dopo il parto. Oltre a quanto osservato per gli animali genitori (cfr. i paragrafi 43 e 44), deve essere registrato qualsiasi comportamento anomalo della prole.

49. Occorre misurare la distanza anogenitale (AGD) di ogni piccolo nello stesso giorno dalla nascita, tra il PND 0 e il PND 4. Il peso corporeo del piccolo va registrato il giorno in cui ne viene misurata l'AGD, che deve essere normalizzata in funzione della taglia, preferibilmente usando la radice cubica del peso corporeo (14). Va contato il numero di capezzoli/areole nei piccoli di sesso maschile il PND 12 o 13, come raccomandato nella linea guida n. 151 dell'OCSE (15).

Peso corporeo e consumo di cibo/acqua

50. I maschi e le femmine devono essere pesati il primo giorno della somministrazione, in seguito almeno settimanalmente, e al termine della somministrazione. Le femmine devono essere pesate durante la gravidanza i giorni 0, 7, 14 e 20 ed entro 24 ore dal parto (giorno 0 o 1 dopo il parto) e almeno il quarto e il tredicesimo giorno dopo il parto. Queste osservazioni vanno riportate singolarmente per ciascun animale adulto.

51. Durante il periodo precedente l'accoppiamento e durante la gravidanza e l'allattamento, l'assunzione di cibo deve essere misurata almeno una volta alla settimana. La misurazione dell'assunzione di cibo durante l'accoppiamento è facoltativa. Se la sostanza chimica in esame è somministrata con acqua da bere, durante questi periodi va misurata anche l'assunzione di acqua.

Ematologia

52. Una volta durante lo studio devono essere effettuati i seguenti esami ematologici su cinque maschi e cinque femmine, selezionati da ciascun gruppo secondo un criterio di casualità: ematocrito, concentrazioni di emoglobina, conteggio degli eritrociti, reticulociti, conteggio totale e differenziale dei leucociti, numero di placchette e misura del tempo e del potenziale di coagulazione. Se la sostanza in esame o i suoi metaboliti putativi hanno o possono avere proprietà ossidanti occorre effettuare altre analisi, relative tra l'altro alla concentrazione di metaemoglobine o ai corpi di Heinz.

53. I campioni di sangue devono essere prelevati da un determinato sito. Durante il prelievo dei campioni le femmine devono trovarsi in uno stato fisiologico simile. Allo scopo di evitare le difficoltà pratiche connesse alla variabilità all'inizio della gestazione, i prelievi di sangue nelle femmine possono essere effettuati alla fine del periodo precedente l'accoppiamento in alternativa al prelievo dei campioni di sangue al momento della soppressione degli animali o nel periodo immediatamente precedente. Per i maschi, i campioni di sangue devono essere prelevati di preferenza al momento della soppressione degli animali o nel periodo immediatamente precedente. In alternativa, i prelievi di sangue nei maschi possono essere effettuati anche alla fine del periodo precedente l'accoppiamento se per le femmine è stato prescelto questo momento.

54. I campioni devono essere conservati in condizioni adeguate.

Biochimica clinica

55. Le determinazioni biochimiche cliniche per lo studio degli effetti tossici gravi sui tessuti e, specificamente, degli effetti su reni e fegato, vanno condotte su campioni di sangue prelevati dai cinque maschi e dalle cinque

▼M8

femmine di ciascun gruppo selezionati. Si raccomanda di lasciare gli animali a digiuno la notte precedente la raccolta dei campioni [1]. Le analisi sul plasma o sul siero comprenderanno il sodio, il potassio, il glucosio, il colesterolo totale, l'urea, la creatinina, le proteine totali e l'albumina, almeno due enzimi indicatori degli effetti epatocellulari (come l'alanina aminotransferasi, l'aspartato aminotransferasi e la sorbitol deidrogenasi). Le determinazioni di altri enzimi (di origine epatica o di altro tipo) e della bilirubina possono talvolta fornire indicazioni utili.

56. Vanno prelevati campioni di sangue da un sito specifico in base al seguente programma:

— da almeno due piccoli per nidiata il quarto giorno dopo la nascita, se il numero di piccoli lo consente (cfr. i paragrafi 40-41)

— da tutte le madri e almeno due piccoli di 13 giorni per nidiata al termine dell'esperimento e

— da tutti i maschi adulti, al termine dell'esperimento.

Tutti i campioni di sangue vanno conservati in condizioni adeguate. Si procede alla valutazione della concentrazione sierica per gli ormoni tiroidei (T4) nei campioni di sangue dei piccoli di 13 giorni e degli adulti maschi. Se del caso, si effettua un'ulteriore valutazione dell'ormone T4 nei campioni di sangue delle madri e dei piccoli di 4 giorni. Se opportuno, si possono misurare facoltativamente anche i livelli di altri ormoni. I prelievi di sangue dei piccoli possono essere raggruppati per nidiata ai fini dell'analisi degli ormoni tiroidei. Gli ormoni tiroidei (T4 e TSH) sono misurati di preferenza come «totale».

57. A titolo facoltativo, nel corso dell'ultima settimana dello studio si possono effettuare le seguenti analisi delle urine su campioni raccolti in momenti specifici: aspetto, volume, osmolalità o densità relativa, pH, proteine, glucosio e sangue/cellule ematiche.

58. È inoltre necessario considerare la possibilità di condurre studi sui marker sierologici dei danni generici ai tessuti. Altre determinazioni dovranno essere eseguite qualora si abbia motivo di ritenere o di sospettare che le proprietà della sostanza chimica in esame possano alterare i profili metabolici riguardanti il calcio, il fosfato, i trigliceridi a digiuno e la glicemia a digiuno, gli ormoni specifici, la metemoglobina e la colinesterasi. Questi devono essere confermati caso per caso.

59. I fattori seguenti possono influenzare la variabilità e le concentrazioni assolute delle analisi ormonali:

— momento della soppressione, per via della variazione diurna delle concentrazioni ormonali;

[1] Per svariate misurazioni del siero e del plasma, e soprattutto per il glucosio, sarebbe preferibile mantenere il digiuno per tutta la notte. Il motivo principale è che l'aumento della variabilità dovuto inevitabilmente al mancato digiuno tenderebbe a mascherare effetti meno evidenti rendendo più difficile l'interpretazione. Dall'altro lato, però, il digiuno notturno può interferire con il metabolismo generale degli animali (delle femmine gravide), interferisce con l'allattamento e, soprattutto negli studi sull'alimentazione, può incidere sull'esposizione quotidiana alla sostanza chimica in esame. Se si opta per il digiuno notturno, gli esami biochimico-clinici dovranno essere effettuati dopo le osservazioni funzionali della quarta settimana per i maschi. Le madri devono essere mantenute in vita per un altro giorno dopo la rimozione dei piccoli, ad esempio il tredicesimo giorno dopo il parto. Le madri devono essere tenute a digiuno notturno dal tredicesimo o quattordicesimo giorno di allattamento e il sangue prelevato prima della soppressione deve essere utilizzato per i parametri di chimica clinica.

▼M8

— metodi di soppressione, evitando di stressare inutilmente gli animali in quanto ciò potrebbe incidere sulle concentrazioni ormonali;

— kit per le analisi ormonali che possono differire per le loro curve standard.

60. I campioni di plasma destinati specificatamente all'analisi ormonale devono essere prelevati nelle stesse ore della giornata. I valori numerici ottenuti dalle analisi delle concentrazioni ormonali differiscono in funzione dei kit disponibili in commercio utilizzati.

61. Se i dati di riferimento storici sono inadeguati, occorre tenere conto delle variabili ematologiche e di biochimica clinica prima di iniziare i dosaggi, di preferenza su un gruppo di animali diverso dal gruppo in esame. Per le femmine, i dati devono riguardare animali che allattano.

PATOLOGIA

Necroscopia macroscopica

62. Tutti gli animali adulti utilizzati nello studio vanno sottoposti a un'autopsia macroscopica completa e dettagliata che comprenda un attento esame della superficie esterna del corpo, di tutti gli orifizi e delle cavità cranica, toracica e addominale e del loro contenuto. Occorre prestare particolare attenzione agli organi dell'apparato riproduttivo e prendere nota del numero dei siti di impianto. Gli strisci vaginali devono essere esaminati il giorno dell'autopsia per determinare lo stadio del ciclo estrale e consentire di stabilire correlazioni con l'istopatologia degli organi riproduttivi femminili.

63. Testicoli ed epididimi, come pure l'insieme composto dalla prostata e dalle vescicole seminali con le ghiandole della coagulazione, di tutti i maschi adulti vanno opportunamente liberati da eventuali tessuti aderenti e pesati umidi immediatamente dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento. Inoltre, si possono pesare facoltativamente altri organi, come l'insieme del muscolo elevatore dell'ano e del muscolo bulbocavernoso, le ghiandole bulbouretrali e il glande nei maschi e le due ovaie (peso a umido) e l'utero (compresa la cervice) nelle femmine; se effettuate, queste misurazioni facoltative devono avvenire subito dopo la dissezione. Le ovaie, i testicoli, gli epididimi, gli organi sessuali accessori e tutti gli organi degli animali adulti che presentano lesioni macroscopiche devono essere conservati.

64. Per tutti i maschi e le femmine adulti e per un piccolo maschio e un piccolo femmina di tredici giorni di ciascuna nidiata, le ghiandole della tiroide devono essere conservate nel mezzo di fissazione più adatto per il successivo esame istopatologico che si intende effettuare. Il peso della tiroide può essere stabilito dopo la fissazione. Anche in questo caso l'ablazione deve essere eseguita con cautela e solo previa fissazione per evitare di danneggiare i tessuti. L'eventuale danneggiamento dei tessuti infatti potrebbe compromettere l'analisi istopatologica. I campioni di sangue devono essere prelevati da un determinato sito immediatamente prima o durante la soppressione degli animali e conservati in condizioni adeguate (cfr. il paragrafo 56).

▼M8

65. Inoltre, per almeno cinque maschi e femmine adulti, selezionati a caso da ciascun gruppo (tranne quelli trovati moribondi e/o sacrificati prima della conclusione dello studio), fegato, reni, ghiandole surrenali, timo, milza, cervello e cuore vanno opportunamente liberati da eventuali tessuti aderenti e pesati umidi immediatamente dopo la dissezione, per evitare l'essiccamento. I seguenti tessuti vanno conservati nel mezzo di fissazione più adatto, sia per il tipo di tessuto, sia per il successivo esame istopatologico che si intende effettuare: tutte le lesioni macroscopiche, cervello (porzioni rappresentative comprendenti cervello, cervelletto e ponte), midollo spinale, occhi, stomaco, intestino tenue e crasso (comprese le placche di Peyer), fegato, reni, ghiandole surrenali, milza, cuore, timo, trachea e polmoni (conservati con dilatazione mediante fissativo e poi immersione), gonadi (testicoli e ovaie), organi sessuali accessori (utero e collo dell'utero, epididimi, prostata, vescicole seminali con ghiandole della coagulazione), vagina, vescica e linfonodi [oltre al linfonodo più vicino un altro linfonodo, in funzione dell'esperienza del laboratorio (16)], nervo periferico (sciatico o tibiale) preferibilmente in prossimità del muscolo, muscolo e osso dello scheletro con il midollo osseo (una sezione o un preparato fresco di midollo osseo aspirato). Si raccomanda di fissare i testicoli mediante immersione in un fissativo di Bouin o di Davidson modificato (16) (17) (18); la fissazione in formalina è sconsigliata per questi tessuti. La tunica albuginea può essere perforata, con un ago, con delicatezza e superficialmente in entrambi i poli dell'organo per consentire la rapida penetrazione del fissativo. I risultati clinici e di altro tipo possono evidenziare la necessità di esaminare altri tessuti. Vanno inoltre conservati tutti gli organi considerati organi bersaglio in base alle proprietà note della sostanza in esame.

66. I tessuti elencati qui di seguito possono apportare informazioni utili sugli effetti endocrini: gonadi (ovaie e testicoli), organi sessuali accessori (utero, collo dell'utero, epididimi, vescicole seminali con ghiandole di coagulazione, prostata dorso laterale e ventrale), vagina, ipofisi, ghiandola mammaria maschile e ghiandola surrenale. Non ci sono sufficienti riscontri di alterazioni nelle ghiandole mammarie maschili, ma questo parametro può essere molto sensibile alle sostanze con attività estrogenica. L'osservazione degli organi/tessuti non ripresi nel paragrafo 65 è facoltativa.

67. I piccoli morti o soppressi il tredicesimo giorno dopo il parto, o poco dopo, devono essere sottoposti almeno a un attento esame esterno volto a individuare eventuali anomalie evidenti. Particolare attenzione deve essere dedicata all'apparato riproduttivo esterno, che va esaminato alla ricerca di eventuali alterazioni dello sviluppo.

Esame istopatologico

68. Gli organi e i tessuti conservati di tutti gli animali selezionati del gruppo di controllo e del gruppo trattato con la dose più elevata vanno sottoposti a un esame istopatologico completo (con particolare attenzione alle fasi della spermatogenesi nelle gonadi maschili e dell'istopatologia della struttura delle cellule interstiziali dei testicoli). La ghiandola della tiroide dei piccoli e degli animali adulti restanti può essere esaminata se necessario. Si procede a questi esami anche sugli animali degli altri gruppi se nel gruppo cui viene somministrata la dose più elevata si osservano alterazioni correlate al trattamento. Il documento di orientamento sull'istopatologia (10) fornisce informazioni supplementari sulla dissezione, la fissazione, l'asportazione e l'istopatologia dei tessuti endocrini.

69. Vanno esaminate tutte le lesioni macroscopiche. Allo scopo di contribuire alla determinazione dei NOAEL, devono essere esaminati gli organi bersaglio di altri gruppi-dose, soprattutto dei gruppi che presenterebbero un NOAEL.

▼M8

70. Quando si utilizza un gruppo satellite l'esame istopatologico va eseguito sui tessuti e sugli organi per i quali sono stati osservati effetti nei gruppi trattati.

DATI E RELAZIONE

Dati

71. Devono essere forniti dati individuali su ciascun animale. Inoltre, tutti i dati vanno riassunti sotto forma di tabella, evidenziando per ciascun gruppo di studio il numero di animali all'inizio della prova, il numero di animali rinvenuti morti durante la prova o sottoposti a eutanasia, il momento di eventuali decessi o soppressioni, il numero di animali fertili, il numero di femmine gravide, il numero di animali che mostrano segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati, ivi compresi il momento dell'insorgenza, la durata e la gravità degli effetti tossici, i tipi di alterazioni istopatologiche, nonché tutti i dati di rilievo riguardanti le nidiate. Un formato tabulare di relazione sintetica che si è rivelato molto utile per la valutazione degli effetti sulla riproduzione/sullo sviluppo è contenuto nell'appendice 3.

72. Se possibile, i risultati numerici devono essere valutati sulla base di un metodo statistico appropriato e comunemente accettato. Per i confronti degli effetti osservati nell'ambito di un intervallo di dosaggio si deve evitare il ricorso a prove t multiple. I metodi statistici devono essere selezionati durante la fase di progettazione dello studio. L'analisi statistica dell'AGD e della retrazione del capezzolo deve essere basata sui dati individuali dei piccoli, tenendo conto degli effetti sulle nidiate. Se opportuno, utilizzare la nidiata come unità di analisi. L'analisi statistica del peso corporeo dei piccoli deve essere basata sui dati individuali dei piccoli, tenendo conto delle dimensioni della nidiata. Tenuto conto della portata ridotta dello studio, le analisi statistiche sotto forma di prove intese ad accertare la «significatività» dei risultati hanno un valore limitato per molti endpoint, soprattutto quelli riproduttivi. Alcuni dei metodi più ampiamente utilizzati, soprattutto le prove parametriche per la valutazione della tendenza centrale, sono inadeguati. Se si ricorre ad analisi statistiche, il metodo scelto deve essere adatto alla distribuzione della variabile esaminata e selezionato prima dell'inizio dello studio.

Valutazione dei risultati

73. I risultati del presente studio di tossicità vanno valutati in base agli effetti osservati e ai risultati della necroscopia e dell'esame microscopico. La valutazione deve includere il rapporto fra la dose della sostanza chimica in esame e la presenza o l'assenza, l'incidenza e la gravità delle anomalie, comprese eventuali lesioni macroscopiche, gli organi bersaglio identificati, l'infertilità, le anomalie cliniche, la capacità riproduttiva, gli effetti sulla generazione successiva, le alterazioni del peso corporeo, gli effetti sulla mortalità ed eventuali altri effetti tossici.

74. Tenuto conto del breve periodo di trattamento del maschio, l'istopatologia dei testicoli e degli epididimi deve essere considerata insieme ai dati sulla fertilità nel quadro della valutazione degli effetti sulla riproduttività del maschio. Può essere utile anche utilizzare eventuali dati di controllo storici sulla riproduzione/lo sviluppo (ad esempio per le dimensioni della nidiata, l'AGD, la retrazione del capezzolo, i livelli sierici di T4) per facilitare l'interpretazione dello studio.

75. Ai fini del controllo di qualità, si suggerisce di raccogliere dati di controllo storici e di calcolare i coefficienti di variazione per i dati numerici, in particolare per i parametri legati all'individuazione degli interferenti endocrini. Questi dati possono essere utilizzati, a fini di confronto, in fase di valutazione degli studi effettivamente realizzati.

▼M8

Relazione sull'esecuzione della prova

76. La relazione sull'esecuzione della prova deve comprendere le seguenti informazioni:

Sostanza chimica in esame:

— origine, numero di lotto, data limite per l'uso, se disponibili;

— stabilità della sostanza chimica in esame, se nota;

Sostanza monocostituente:

— aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;

— dati di identificazione chimica: denominazioni IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale, purezza, identità chimica delle impurezze, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc.;

Sostanza multicostituente, UVCB e miscele:

— caratterizzate nella massima misura possibile con l'identità chimica (cfr. sopra), con la presenza quantitativa e con le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti;

Mezzo disperdente (se del caso):

— giustificazione per la scelta del mezzo disperdente utilizzato, se diverso dall'acqua;

Animali utilizzati nella prova:

— specie/ceppo impiegati;

— numero, età e sesso degli animali;

— origine, condizioni di alloggio, dieta, ecc.;

— peso di ciascun animale all'inizio della prova;

— qualora non siano stati utilizzati ratti, spiegazione del motivo;

Condizioni sperimentali:

— criteri di selezione delle dosi;

— informazioni dettagliate sulla formulazione della sostanza chimica in esame/incorporazione nella dieta, sulla concentrazione finale, sulla stabilità e sull'omogeneità del preparato;

▼M8

— modalità precise di somministrazione della sostanza chimica in esame;

— se del caso, conversione della concentrazione della sostanza nella dieta o nell'acqua (ppm) in dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno);

— dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua;

— descrizione dettagliata del protocollo di randomizzazione utilizzato per selezionare gli eventuali piccoli da sopprimere;

Risultati:

— peso corporeo/cambiamenti del peso corporeo;

— assunzione di cibo ed eventualmente di acqua;

— dati sulla risposta tossica per sesso e per dose, compresa la fertilità, la gestazione ed eventuali altri sintomi di

— tossicità;

— durata della gestazione, effetti tossici o di altro tipo sulla riproduzione, sulla prole, sulla crescita postnatale, ecc.;

— natura, gravità e durata dei segni clinici (sia reversibili che non reversibili);

— valutazione dell'attività sensoriale, della forza prensile e dell'attività motoria;

— esami ematologici con i relativi valori basali;

— esami biochimici clinici con i relativi valori basali;

— numero di femmine adulte con ciclo estrale normale o anomalo e durata del ciclo;

— numero di nati vivi e di perdite post-impianto;

— numero di piccoli con anomalie evidenti; valutazione macroscopica degli organi genitali esterni, numero di esemplari più piccoli del normale;

— momento del decesso durante lo studio o indicazione della sopravvivenza degli animali alla conclusione della prova;

— numero di impianti e dimensioni e peso della nidiata al momento della registrazione;

— dati relativi al peso corporeo dei piccoli;

— AGD di tutti i piccoli (e peso corporeo il giorno della misurazione dell'AGD);

— retrazione del capezzolo nei piccoli di sesso maschile;

— livelli di ormoni tiroidei, piccoli di 13 giorni e maschi adulti (e madri e piccoli di 4 giorni se sottoposti a misurazione);

— peso corporeo al momento della soppressione e dati sul peso degli organi negli animali genitori;

— risultati della necroscopia;

— descrizione dettagliata dei risultati istopatologici;

— dati sull'assorbimento (se disponibili);

— elaborazione statistica dei risultati, se del caso.

Discussione dei risultati

Conclusioni

▼M8

Interpretazione dei risultati

77. Lo studio fornirà valutazioni della tossicità per la riproduzione/lo sviluppo associata alla somministrazione di dosi ripetute. In particolare, poiché lo studio verte sia sulla tossicità generale sia sugli endpoint di tossicità per la riproduzione/lo sviluppo, i risultati consentiranno di distinguere gli effetti sulla riproduzione o sullo sviluppo che si osservano in assenza di tossicità generale da quelli espressi solo a livelli che risultano tossici anche per gli animali genitori (cfr. i paragrafi 7-11). Esso può fornire indicazioni sulla necessità di condurre ulteriori indagini e orientamenti in merito alla progettazione di studi successivi. Si consulti il documento di orientamento n. 43 dell'OCSE per indicazioni sull'interpretazione dei risultati in merito alla riproduzione e allo sviluppo (19). Il documento di orientamento dell'OCSE n. 106 sulla valutazione istologica delle prove endocrine e sulla riproduzione nei roditori (16) fornisce informazioni sulla preparazione e la valutazione degli organi (endocrini) e degli strisci vaginali che possono essere utili per il presente metodo di prova.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Disponibile su richiesta presso l'Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico (OCSE), Parigi.

(2) OECD (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Disponibile su richiesta presso l'Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico (OCSE), Parigi.

(3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. *Toxicol*, Sci., 19, 141-149.

(4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Appl. *Toxicol*., 18, 89-95.

(5) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(6) OECD (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

(8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M.and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

(9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No 60).

(11) Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol*. Appl. *Pharmacol*., 108, 267-283.

(12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. *Toxicol*., 1, 233-236.

(13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.

(14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). «Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights», Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(15) OECD (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(16) OECD (2009).Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(17) Hess RA and Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol*. 30, 524-533.

(19) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(20) OECD (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

▼**M8**

Appendice 1

DEFINIZIONI (CFR. ANCHE LA LINEA GUIDA N. 150 DELL'OCSE (20))

Androgenicità la capacità di una sostanza chimica di agire come un ormone androgenico naturale (ad es. il testosterone) in un mammifero.

Antiandrogenicità la capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività di un ormone androgenico naturale (ad es. il testosterone) in un mammifero.

Antiestrogenicità la capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività di un ormone estrogenico naturale (ad es. l'estradiolo 17ß) in un mammifero.

Attività antitiroidea la capacità di una sostanza chimica di inibire l'attività di un ormone tiroideo naturale (ad es. T_3) in un mammifero.

Sostanza chimica una sostanza o una miscela.

Tossicità per lo sviluppo la manifestazione della tossicità per la riproduzione, che risulta in disturbi prenatali, perinatali, postnatali, strutturali o funzionali nella progenie.

Dose quantità di sostanza chimica somministrata. La dose è espressa col peso della sostanza chimica in esame per unità di peso corporeo dell'animale utilizzato nella prova per giorno (mg/kg peso corporeo/giorno) o come una concentrazione costante nella dieta.

Dosaggio termine generale che ricomprende la dose, la frequenza e la durata della somministrazione.

Tossicità evidente termine generale che designa i segnali evidenti di tossicità a seguito della somministrazione di una sostanza chimica. Questi segni devono essere sufficienti per consentire la valutazione dei pericoli ed essere tali che si possa prevedere che l'aumento della dose somministrata comporti la comparsa di segni di tossicità grave e probabilmente la mortalità.

Compromissione della fertilità i disturbi delle funzioni o della capacità riproduttive maschili o femminili.

Tossicità materna gli effetti nocivi sulle femmine gravide, che si verificano in modo specifico (effetto diretto) o non specifico (effetto indiretto) e correlati allo stato di gravidanza.

NOAEL l'abbreviazione di n*o-observed-adverse-effect level*, ossia la dose più elevata alla quale non si osservano effetti avversi legati al trattamento.

Estrogenicità la capacità di una sostanza chimica di agire come un ormone estrogenico naturale (ad es. l'estradiolo 17ß) in un mammifero.

Tossicità della riproduzione gli effetti nocivi sulla progenie e/o la compromissione delle funzioni o della capacità riproduttive maschili e femminili.

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

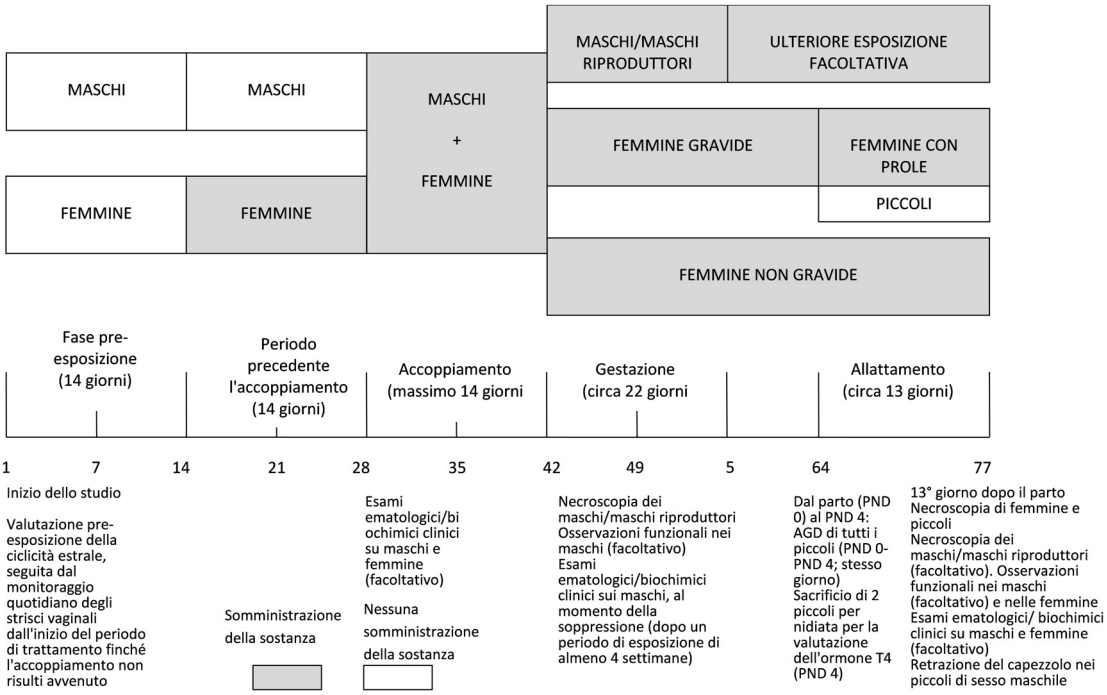
Attività tiroidea la capacità di una sostanza chimica di agire come un ormone tiroideo naturale (ad es. T_3) in un mammifero.

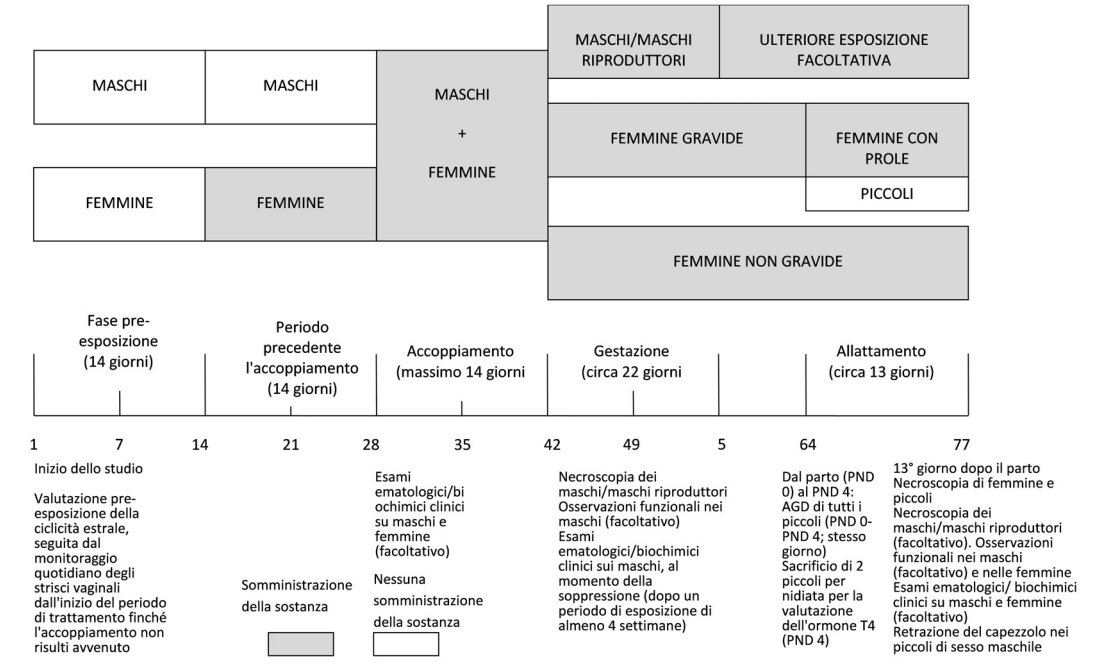
Validazione processo scientifico destinato a caratterizzare i requisiti e i limiti operativi di un metodo di prova e a dimostrarne l'affidabilità e la pertinenza per un fine specifico.

▼**M8**

Appendice 2

DIAGRAMMA DEL PROTOCOLLO SPERIMENTALE INDICANTE LA DURATA MASSIMA DELLO STUDIO, BASATO SU UN PERIODO DI ACCOPPIAMENTO COMPLETO DI 14 GIORNI





▼**M8**

Appendice 3

RELAZIONE SINTETICA IN FORMATO TABULARE DEGLI EFFETTI SULLA RIPRODUZIONE/SULLO SVILUPPO

OSSERVAZIONI	VALORI				
Dosaggio (unità)…….	0 (controllo)	…	…	…	…
Coppie formate (N)					
Ciclo estrale (almeno durata media e frequenza dei cicli irregolari)					
Femmine per le quali la copulazione risulta avvenuta (N)					
Femmine gravide (N)					
Giorni di concepimento 1 - 5 (N)					
Giorni di concepimento 6 -…[[1]] [(1)] (N)					
Gravidanza≤21 giorni (N)					
Gravidanza = 22 giorni (N)					
Gravidanza ≥ 23 giorni (N)					
Madri che hanno partorito piccoli vivi (N)					
Madri con piccoli vivi il quarto giorno dopo il parto (N)					
Impianti/madre (media)					
Piccoli vivi/madre alla nascita (media)					
Piccoli vivi/madre al quarto giorno (media)					
Rapporto numerico tra i sessi (m/f) alla nascita (media)					
Rapporto numerico tra i sessi (m/f) al quarto giorno (media)					
Peso della nidiata alla nascita (media)					
Peso della nidiata al quarto giorno (media)					
Peso dei piccoli alla nascita (media)					
Peso dei piccoli al momento della misurazione dell'AGD (media maschi, media femmine)					
AGD dei piccoli misurata lo stesso giorno dalla nascita, tra la nascita e il giorno 4 (media maschi, media femmine, prendere nota del PND)					
Peso dei piccoli al quarto giorno (media)					
Peso dei piccoli al tredicesimo giorno (media)					

▼M8

OSSERVAZIONI	VALORI				
Retrazione del capezzolo dei piccoli maschi al tredicesimo giorno (media)					
PICCOLI CON ANOMALIE					
Madri con 0					
Madri con 1					
Madri con ≥ 2					
PERDITA DELLA PROGENIE					
Perdite prenatali (impianti meno piccoli nati vivi)					
Femmine con 0					
Femmine con 1					
Femmine con 2					
Femmine con ≥ 3					
Perdite postnatali (piccoli nati vivi meno piccoli vivi il tredicesimo giorno dopo il parto)					
Femmine con 0					
Femmine con 1					
Femmine con 2					
Femmine con ≥ 3					

(1) Ultimo giorno del periodo di accoppiamento

▼M8

B.65. METODO DI PROVA *IN VITRO* CON MEMBRANA IMPERMEABILE PER LA CORROSIONE CUTANEA

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida OCSE. n. 435 (2015) Per corrosione cutanea si intende la produzione di lesioni irreversibili della pelle sotto forma di necrosi visibili nell'epidermide e nel derma, a seguito dell'applicazione di una sostanza chimica in esame, secondo la definizione del Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (sistema GHS dell'ONU) (1) e 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 (in appresso «regolamento CLP» ([1])). Il presente metodo, equivalente alla linea guida aggiornata n. 435 dell'OCSE, costituisce un metodo di prova *in vitro* su membrana impermeabile che può essere utilizzato per individuare le sostanze chimiche corrosive. Il presente metodo di prova prevede l'utilizzo di una membrana artificiale destinata a reagire alle sostanze chimiche corrosive in modo analogo alla cute degli animali *in situ*.

2. La corrosività cutanea è generalmente valutata applicando la sostanza chimica in esame sulla pelle di animali vivi e determinando l'ampiezza della lesione dei tessuti dopo un determinato lasso di tempo (2). Oltre al presente metodo di prova, per individuare le sostanze chimiche corrosive sono stati adottati alcuni metodi di prova *in vitro* come alternativa (3) (4) al metodo standard *in vivo* sui conigli (Capitolo B.4 del presente allegato, equivalente alla linea guida n. 404 dell'OCSE). La strategia di prova e valutazione su più livelli del sistema GHS dell'ONU per la stima e la classificazione della corrosività cutanea e le linee guida dell'OCSE sugli approcci integrati di prova e valutazione (*Integrated Approaches to Testing and Assessment* - IATA) per l'irritazione e la corrosione cutanea autorizzano l'utilizzo di procedure di prova *in vitro* validate e accettate di cui ai moduli 3 e 4 (1)(5). Le linee guida IATA descrivono diversi moduli che raggruppano le fonti di informazione e gli strumenti di analisi e i) forniscono orientamenti su come integrare e utilizzare i dati sperimentali e altri tipi di dati per valutare il potenziale di irritazione e di corrosione cutanea delle sostanze chimiche in esame e ii) propongono un approccio quando sono necessarie prove aggiuntive, anche quando si ottengono risultati negativi (5). Nell'ambito di questo approccio modulare, i risultati positivi dei metodi di prova *in vitro* possono essere utilizzati per classificare una sostanza chimica nella categoria «corrosivo» senza dover effettuare prove sugli animali, riducendo ed ottimizzando dunque l'utilizzo degli animali e evitando dolore e stress agli stessi.

3. Sono stati realizzati studi di validazione del modello *in vitro* della membrana impermeabile reperibile in commercio sotto il nome Corrositex® (6)(7)(8), che hanno evidenziato una precisione del 79 % per quanto riguarda la previsione della corrosività cutanea (128/163), una sensibilità dell'85 % (76/89) e una specificità del 70 % (52/74) per una base di dati di 163 sostanze chimiche e miscele (7). Sulla base della sua validità riconosciuta, l'utilizzo di questo metodo di riferimento validato (*validated reference method* - VRM) è stato raccomandato nell'ambito di una strategia sperimentale su più livelli per valutare il rischio potenziale di corrosione cutanea generato dalle sostanze chimiche (5)(7). Prima di poter utilizzare a fini regolamentari un modello *in vitro* di membrana impermeabile per valutare la corrosione cutanea, occorre determinarne l'affidabilità, la pertinenza (accuratezza) e i limiti per l'uso proposto al fine di garantire che sia equivalente al VRM (9), conformemente agli standard di prestazione predefiniti (10). L'applicazione del sistema dell'OCSE di reciproca accettazione dei dati sarà garantito solo

([1]) 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 (GU L 353 del 31.12.2008, pag. 1).

▼M8

una volta che i metodi di prova proposti, nuovi o aggiornati e conformi agli standard di prestazione, sono stati esaminati e integrati nella corrispondente linea guida dell'OCSE. Attualmente la linea guida n. 435 dell'OCSE e il presente metodo di prova coprono un solo un metodo *in vitro*: il modello Corrositex® disponibile in commercio.

4. Altri metodi per le prove sulla corrosività cutanea si basano sull'utilizzo di pelle umana ricostituita (linea guida n. 431 dell'OCSE) (3) e di pelle di ratto ricostituita (linea guida n. 430 dell'OCSE) (4). Il presente metodo di prova consente inoltre la sottocategorizzazione delle sostanze chimiche corrosive nelle tre sottocategorie di corrosività nell'ambito del sistema UN GHS e nei tre gruppi di imballaggio ONU per i trasporti per quanto concerne il rischio di corrosività. La presente linea guida è stata inizialmente adottata nel 2006 e aggiornata nel 2015 per tenere conto del documento di orientamento IATA e aggiornare l'elenco delle sostanze chimiche per la verifica della competenza tecnica.

DEFINIZIONI

5. Le definizioni utilizzate sono riportate nell'appendice.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

6. La prova descritta nel presente metodo di prova consente di individuare le sostanze e le miscele chimiche corrosive e di classificarle in sottocategorie di sostanze corrosive conformemente al sistema GHS dell'ONU/ CLP (tabella 1). Questo metodo di prova può essere utilizzato anche per decidere in merito alla corrosività e alla non corrosività di classi specifiche di sostanze chimiche, ad esempio, gli acidi organici e minerali, i derivati acidi ([1]) e le basi in alcune prove di trasporto (7)(11)(12). Il presente metodo di prova descrive un protocollo generico simile ad un metodo di prova di riferimento validato (7). Il presente metodo di prova non fornisce informazioni adeguate sull'irritazione cutanea, ma è opportuno notare che il metodo di prova B.46 (equivalente alla linea guida n. 439 dell'OCSE) riguarda in modo specifico l'irritazione cutanea *in vitro* e gli effetti sulla salute (13). Per una valutazione completa degli effetti cutanei locali dopo una singola esposizione della pelle, si raccomanda di consultare il documento di orientamento dell'OCSE relativo agli approcci integrati in materia di prove e valutazioni (IATA) (5).

Tabella 1

La categoria e le sottocategorie di corrosività cutanea del sistema GHS dell'ONU ([1])

Categoria di corrosività (categoria 1) (per le autorità che non utilizzano sottocategorie)	Possibili sottocategorie di corrosività ([1]) (per le autorità che utilizzano sottocategorie, ivi compreso il regolamento CLP)	Corrosivo per ≥ 1 animale su 3	
		Esposizione	Osservazioni
Corrosivo	Sottocategoria di corrosione 1A	≤ 3 minuti	≤ 1 ora
	Sottocategoria di corrosione 1B	> 3 minuti / ≤ 1 ora	≤ 14 giorni
	Sottocategoria di corrosione 1C	> 1 ora / ≤ 4 ore	≤ 14 giorni

([1]) Per l'UE, il regolamento CLP applica le tre sottocategorie di corrosione della pelle 1A, 1B e 1C.

7. Un limite del metodo di riferimento validato (7) consiste nel fatto che, in base agli esiti del test di compatibilità iniziale, questo metodo non potrà essere applicato a numerose sostanze chimiche non corrosive e alcune sostanze chimiche corrosive (cfr. il paragrafo 13). Le sostanze acquose aventi

([1]) «Derivato acido» è una designazione di classe non specifica ed è definito in termini generali come una sostanza chimica prodotta a partire da un acido sia direttamente sia mediante modifica o parziale sostituzione. Questa classe comprende anidridi, acidi alogenati, sali e altri tipo di sostanze chimiche.

▼M8

un pH compreso tra 4,5 e 8,5 spesso non sono adattate alla prova; tuttavia, l'85 % delle sostanze chimiche testate in questa gamma di valori del pH è risultato non corrosivo per i test sugli animali (7). Il metodo *in vitro* della membrana impermeabile può essere utilizzato per testare solidi (solubili o insolubili in acqua), liquidi (acquosi o non acquosi) ed emulsioni. Tuttavia, le sostanze chimiche in esame che non causano un cambiamento rilevabile nella prova di compatibilità, ad esempio, un cambiamento di colore nel sistema di rilevamento chimico (*Chemical Detection System* - CDS) del metodo di prova di riferimento validato, non possono essere sottoposte a prova con il metodo della membrana impermeabile, rendendo necessario il ricorso ad altri metodi di prova.

PRINCIPIO DELLA PROVA

8. Il sistema di prova si compone di due elementi: una biobarriera macromolecolare sintetica e un sistema di rilevamento chimico (CDS); in questo metodo di prova il CDS rileva i danni provocati dalle sostanze chimiche in esame corrosive sulla membrana impermeabile dopo l'applicazione della sostanza chimica in esame sulla superficie della membrana impermeabile macromolecolare sintetica (7), danni che probabilmente sono dovuti a uno o più dei meccanismi di corrosione simili a quelli che agiscono sulla pelle viva.

9. Si può misurare la penetrazione della membrana impermeabile (o la sua permeazione) mediante una serie di procedure o CDS, in particolare un cambiamento di colore di un colorante indicatore di pH o di qualsiasi altra proprietà della soluzione di indicatore situata sotto la barriera.

10. Occorre stabilire l'idoneità della membrana impermeabile, ossia la sua pertinenza e affidabilità, per l'uso previsto. Occorre quindi assicurarsi che le varie preparazioni garantiscano le proprietà di impermeabilità, ossia che siano in grado di mantenere una barriera contro le sostanze chimiche non corrosive, e siano atte a classificare le proprietà corrosive delle sostanze chimiche in varie sottocategorie di corrosività nell'ambito del sistema GHS dell'ONU (1). La classificazione assegnata si basa sul tempo impiegato dalla sostanza chimica per penetrare attraverso la membrana impermeabile fino alla soluzione di indicatore.

DIMOSTRAZIONE DELLA COMPETENZA DI LABORATORIO

11. Prima di utilizzare sistematicamente il metodo della barriera impermeabile *in vitro*, i laboratori sono tenuti a dimostrare la loro competenza tecnica classificando correttamente le dodici sostanze di riferimento raccomandate nella tabella 2. Qualora una sostanza elencata non sia disponibile o nel caso in cui sia giustificato, può essere utilizzata un'altra sostanza per la quale sono disponibili dati di riferimento *in vivo* e *in vitro* (ad esempio scegliendo dalla lista delle sostanze chimiche di riferimento (10)), a condizione che siano applicati i medesimi criteri di selezione di cui alla tabella 1.

Tabella 2

Sostanze chimiche per la verifica della competenza tecnica [1]

Sostanza [2]	Numero di registrazione CAS)	Classe chimica	Sottocategoria GHS ONU *in vivo* [3]	Sottocategoria GHS ONU *in vitro* [3]
Trifluoruro di boro diidrato	13319-75-0	Acidi inorganici	1A	1A
Acido nitrico	7697-37-2	Acidi inorganici	1A	1A
Pentacloruro di fosforo	10026-13-8	Precursori di acidi inorganici	1A	1A
Cloruro di valerile	638-29-9	Cloruri di acidi	1B	1B
Idrossido di sodio	1310-73-2	Basi inorganiche	1B	1B

▼M8

Sostanza ([2])	Numero di registrazione CAS)	Classe chimica	Sottocategoria GHS ONU *in vivo* ([3])	Sottocategoria GHS ONU *in vitro* ([3])
1-(2-Amminoetil) piperazina	140-31-8	Ammine alifatiche	1B	1B
Cloruro di benzensolfonile	98-09-9	Cloruri di acidi	1C	1C
N,N-dimetil benzilammina	103-83-3	Aniline	1C	1C
Tetraetilene pentammina	112-57-2	Ammine alifatiche	1C	1C
Eugenolo	97-53-0	Fenoli	NC	NC
Acrilato di nonile	2664-55-3	Acrilati/metacrilati	NC	NC
Bicarbonato di sodio	144-55-8	Sali inorganici	NC	NC

([1]) Le dodici sostanze sopra elencate comprendono tre sostanze provenienti da ciascuna delle tre sottocategorie del sistema GHS dell'ONU per le sostanze corrosive e tre sostanze non corrosive e sono facilmente reperibili in commercio; la determinazione della sottocategoria GHS dell'ONU si basa sui risultati di prove *in vivo* di elevata qualità. Queste sostanze sono ricavate dall'elenco di 40 sostanze di riferimento che figurano nell'elenco minimo delle sostanze chimiche identificate per dimostrare l'accuratezza e l'affidabilità dei metodi di prova strutturalmente e funzionalmente simili al metodo di prova di riferimento validato, e sono state selezionate tra le 163 sostanze chimiche di riferimento originariamente utilizzate per validare il metodo di prova di riferimento (Corrositex®) (7) (10) (14). L'obiettivo di questa procedura di selezione era includere, nella misura del possibile, sostanze chimiche che: fossero rappresentative della gamma delle reazioni di corrosività (ad esempio, sostanze non corrosive; gruppi di imballaggio I, II e III delle Nazioni Unite) che il metodo di prova di riferimento validato è in grado di misurare o prevedere; fossero rappresentative delle classi chimiche usate nel processo di validazione; avessero strutture chimiche ben definite; consentissero di ottenere risultati definitivi con il metodo di prova di riferimento validato *in vivo*; consentissero di ottenere risultati definitivi con il metodo di prova di riferimento *in vivo*; fossero disponibili in commercio; e non comportassero costi di smaltimento proibitivi (14).

([2]) Sostanze analizzate non diluite o con una purezza del 90 %

([3]) I gruppi di imballaggio delle Nazioni Unite I, II e III corrispondono, rispettivamente, alle sottocategorie 1A, 1B e 1C del sistema GHS delle Nazioni Unite. NC; non corrosivo.

PROCEDURA

12. I paragrafi successivi contengono la descrizione dei componenti e delle procedure di un metodo di prova con membrana impermeabile artificiale per la valutazione della corrosività (7) (15) sulla base dell'attuale VRM, ossia il metodo commercialmente disponibile Corrositex®. La membrana impermeabile e le soluzioni di compatibilità e di indicatore nonché le soluzioni che consentono la categorizzazione possono essere prodotte, preparate o acquistate sul mercato, come nel caso del VRM Corrositex®. È disponibile un protocollo del metodo di prova su campione del metodo di prova di riferimento validato (7). Le prove devono essere effettuate a temperatura ambiente (17-25 °C) e i componenti devono soddisfare le condizioni indicate qui di seguito.

Prova di compatibilità della sostanza chimica in esame

13. Prima di eseguire la prova con la membrana impermeabile, si effettua una prova di compatibilità per determinare se la sostanza in esame è rilevabile dal CDS. Se il CDS non rileva la sostanza chimica in esame, il metodo di prova con la membrana impermeabile non è adatto per valutare la potenziale corrosività di questa particolare sostanza chimica e deve essere utilizzato un metodo di prova diverso. Il CDS e le condizioni di esposizione utilizzati per la prova di compatibilità devono riprodurre l'esposizione subita nella successiva prova con la membrana impermeabile.

Prova di categoria di scala temporale della sostanza chimica in esame

14. Se il metodo di prova lo consente, una sostanza chimica che è risultata idonea alla prova di compatibilità può essere oggetto di una prova di categoria di scala temporale, ossia uno screening che consente di distinguere tra acidi o basi deboli e forti. Ad esempio, nel metodo di prova di riferimento validato viene utilizzata una prova di classificazione di scala temporale per

▼M8

stabilire quale delle due scale temporali dovrebbe essere utilizzata a seconda che venga rilevata una riserva acida o una riserva alcalina significativa. Per determinare la corrosività e la sottocategoria GHS dell'ONU per la corrosività cutanea, si dovrebbero usare due diversi tempi di permeazione, in base alla riserva acida o alcalina della sostanza chimica in esame.

COMPONENTI DEL METODO DI PROVA DELLA MEMBRANA IMPERMEABILE

Membrana impermeabile

15. La membrana impermeabile è costituita da due elementi: un gel acquoso macromolecolare proteico e una membrana di supporto permeabile. Il gel proteico dovrebbe essere impermeabile ai liquidi e ai solidi, ma può essere corroso e permeabilizzato. È opportuno conservare la membrana impermeabile pronta all'uso in condizioni prestabilite al fine di evitare il deterioramento del gel, ad esempio per via dell'essiccazione, di una crescita microbica, dello spostamento degli strati, dello screpolamento, che inficerebbero le sue prestazioni. Verrà stabilito un periodo di conservazione accettabile e le preparazioni di membrane impermeabili non saranno utilizzate dopo lo scadere di tale periodo.

16. La membrana di supporto permeabile garantisce un supporto meccanico al gel proteico durante il processo di gelificazione e l'esposizione alla sostanza chimica in esame. La membrana di supporto dovrebbe impedire il cedimento e lo spostamento del gel ed essere facilmente permeabile a tutte le sostanze chimiche in esame.

17. Il gel proteico costituito da proteine (ad esempio cheratina, collagene, o miscele di proteine, che formano una matrice di gel) funge da obiettivo per la sostanza chimica in esame. Il materiale proteico è posto sulla superficie della membrana di sostegno e, dopo la sua gelificazione, si colloca la membrana impermeabile sulla soluzione di indicatore. Il gel proteico dovrebbe essere di pari spessore e densità nel corso dell'intero processo, privo di bolle d'aria o difetti che potrebbero comprometterne l'integrità funzionale.

Sistema di rilevamento chimico (CDS)

18. La soluzione d'indicatore, che è la stessa soluzione utilizzata per la prova di compatibilità, dovrebbe reagire alla presenza di una sostanza chimica in esame. Si può impiegare un colorante o una combinazione di coloranti indicatori di pH, ad esempio il rosso cresolo o il metilarancio, che cambia colore in presenza della sostanza chimica in esame. Il sistema di misurazione può essere visivo o elettronico.

19. È opportuno valutare la pertinenza e l'affidabilità dei sistemi di rilevamento messi a punto per individuare il passaggio della sostanza chimica in esame attraverso la membrana impermeabile al fine di definire la gamma di sostanze chimiche che possono essere rilevate e i limiti quantitativi di rilevamento.

ESECUZIONE DELLA PROVA

Assemblaggio dei componenti del metodo di prova

20. La membrana impermeabile è posta in una fiala (o tubo) contenente la soluzione d'indicatore in modo che la membrana di appoggio sia interamente a contatto con la soluzione d'indicatore e non si formino bolle d'aria. Occorre accertarsi che l'integrità della membrana sia preservata.

▼M8

Applicazione della sostanza chimica in esame

21. Una quantità adeguata della sostanza chimica in esame, ad esempio 500 µl di un liquido o 500 mg di un solido finemente polverizzato (7), viene accuratamente depositata sulla superficie superiore della membrana impermeabile e ripartita in modo uniforme. Per ciascuna sostanza chimica in esame e i controlli corrispondenti viene preparato un numero di repliche adeguato, ad esempio quattro (7) (cfr. i paragrafi da 23 a 25). Si prende nota dell'ora in cui viene applicata la sostanza chimica in esame alla membrana impermeabile. Per garantire la registrazione accurata dei periodi brevi di corrosione, le applicazioni della sostanza chimica in esame nelle fiale sono scaglionate.

Misurazione delle penetrazioni nella membrana impermeabile

22. Ogni fiala è sottoposta a un monitoraggio adeguato, viene registrato il momento del primo cambiamento della soluzione d'indicatore, vale a dire la penetrazione della barriera, e viene determinato il tempo trascorso tra l'applicazione e la penetrazione della membrana impermeabile.

Controlli

23. Nelle prove che prevedono l'utilizzo di un mezzo disperdente o di un solvente con la sostanza chimica di prova, questi devono essere compatibili con il sistema della membrana impermeabile, ossia non devono intaccare l'integrità di tale sistema né modificare la corrosività della sostanza chimica in esame. Se del caso, il controllo con solvente (o con il mezzo disperdente) dovrebbe essere testato in concomitanza per dimostrare la compatibilità del solvente con il sistema della barriera impermeabile.

24. È opportuno inoltre testare contemporaneamente alla sostanza chimica di prova una sostanza chimica di controllo (corrosiva) la cui attività di corrosione è di grado medio, ad esempio 110 ± 15 mg di idrossido di sodio (sottocategoria di corrosività 1B del sistema GHS dell'ONU) (7) al fine di valutare se le prestazioni del sistema sono accettabili. Potrebbe essere utile includere un secondo controllo positivo della stessa classe chimica della sostanza chimica in esame per valutare il potenziale di corrosività relativo di una sostanza chimica in esame corrosiva. Occorre selezionare controlli positivi di media corrosività (sottocategoria 1B del sistema GHS dell'ONU) al fine di individuare i cambiamenti del tempo di penetrazione eventualmente troppo lunghi o troppo brevi rispetto al valore di riferimento stabilito, e che evidenziano pertanto un malfunzionamento del sistema di prova. A tal fine, le sostanze chimiche estremamente corrosive (sottocategoria 1A del sistema GHS dell'ONU) o non corrosive sono di utilità limitata. Una sostanza chimica corrosiva della sottocategoria 1B del sistema GHS dell'ONU consentirebbe di rilevare una durata di permeazione troppo breve o troppo lunga. Una sostanza chimica poco corrosiva (sottocategoria 1C del sistema GHS dell'ONU) potrebbe essere utilizzata come controllo positivo per misurare la capacità del metodo di prova di distinguere sistematicamente le sostanze chimiche poco corrosive da quelle non corrosive. A prescindere dall'approccio utilizzato, occorre stabilire un intervallo accettabile di risposta dei controlli positivi sulla base dell'intervallo storico delle durate di permeazione del o dei controlli positivi utilizzati, ad esempio la media di ± 2-3 deviazioni standard. In ogni studio, è opportuno stabilire il tempo di permeazione esatto del controllo positivo in modo da poter individuare le deviazioni che si situano al di fuori dell'intervallo accettabile.

25. Contemporaneamente alla sostanza chimica in esame occorre testare anche un controllo negativo (non corrosivo), ad esempio acido citrico al 10 % e acido propionico al 6 % (7), per ottenere una misura di controllo di qualità supplementare a dimostrazione dell'integrità funzionale della membrana impermeabile.

▼M8

Criteri di accettabilità dello studio

26. Secondo i parametri di tempo stabiliti per ciascuna sottocategoria di corrosività (del sistema GHS delle Nazioni Unite), il tempo (in minuti) trascorso tra l'applicazione di una sostanza chimica in esame sulla membrana impermeabile e la penetrazione della membrana è utilizzata per prevedere la corrosività della sostanza chimica in esame. Affinché uno studio sia considerato accettabile, il controllo positivo concomitante dovrebbe dare il tempo di risposta di penetrazione previsto (ad esempio 8-16 minuti di tempo permeazione per l'idrossido di sodio se utilizzato come controllo positivo), il controllo negativo concomitante non dovrebbe essere corrosivo e il corrispondente controllo con solvente (se presente) non dovrebbe essere corrosivo né alterare il potenziale di corrosività della sostanza chimica in esame. Prima di utilizzare sistematicamente un metodo conforme al presente metodo di prova, i laboratori sono tenuti a dimostrare la loro competenza tecnica avvalendosi delle 12 sostanze raccomandate nella tabella 2. Per i nuovi metodi «strutturalmente analoghi» sviluppati nell'ambito di questo metodo di prova che sono strutturalmente e funzionalmente simili al metodo di riferimento validato (14), dovrebbero essere utilizzati gli standard di prestazione predefiniti per dimostrare l'affidabilità e l'accuratezza del nuovo metodo prima del suo utilizzo per le prove a fini regolamentari (10).

Interpretazione dei risultati e classificazione di corrosività della sostanza chimica in esame

27. Il tempo (in minuti) trascorso tra l'applicazione della sostanza chimica in esame alla membrana impermeabile e la penetrazione della membrana è utilizzato per classificare la sostanza chimica in esame secondo le sottocategorie GHS dell'ONUI (1) e, se del caso, secondo i gruppi di imballaggio delle Nazioni Unite (16). I valori di tempo limite di ciascuna delle tre sottocategorie di corrosività sono definiti per ciascun metodo di prova proposto. Le decisioni finali sui tempi limite dovrebbero tenere conto dell'esigenza di minimizzare la sottoclassificazione del pericolo di corrosione (ad esempio, falsi negativi). Nella presente linea guida è opportuno utilizzare i tempi limite del metodo Corrositex® descritti nella tabella 3, in quanto si tratta dell'unico metodo di prova che ad oggi rispetta gli orientamenti della linea guida (7).

Tabella 3

Modello predittivo Corrositex®

Tempo medio di permeazione (min.)		Predizione UN GHS (3)
Sostanza chimica in esame di categoria 1 (1) (determinata dalla prova di categorizzazione del metodo)	Sostanza chimica in esame di categoria 2 (2) (determinata dalla prova di categorizzazione del metodo)	
0-3 min.	0-3 min.	Corrosivo Sottocategoria 1A facoltativa
> 3 a 60 min.	> 3 a 30 min.	Corrosivo Sottocategoria 1B facoltativa
> 60 a 240 min.	> 30 a 60 min.	Corrosivo Sottocategoria 1C facoltativa
> 240 min.	> 60 min.	Sostanza chimica non corrosiva

(1) Sostanze chimiche in esame con rapporto acido/alcalino elevato (6).
(2) Sostanze chimiche in esame con rapporto acido/alcalino ridotto (6).
(3) Le sottocategorie UN GHS 1A, 1B e 1C corrispondono ai gruppi di imballaggio I, II e III rispettivamente.

▼M8

DATI E RELAZIONE

Dati

28. Il tempo (in minuti) trascorso tra l'applicazione della sostanza in esame e la penetrazione della barriera per la sostanza in esame e il o i controlli positivi devono essere riportati sotto forma di tabelle contenenti i risultati di ciascuna replica e come media ± di deviazione standard per ciascuna prova.

Relazione sull'esecuzione della prova

29. La relazione sull'esecuzione della prova deve comprendere le seguenti informazioni.

Sostanze chimiche in esame e sostanze di controllo:

— sostanza monocostituente: identificazione chimica, come denominazioni IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale, purezza, identità chimica delle impurezze se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc.;

— sostanza multicostituente, UVCB o miscela: caratterizzata, nella misura del possibile, attraverso l'identità chimica (cfr. sopra), le proporzioni quantitative e le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti;

— aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche pertinenti;

— origine, numero del lotto se disponibile;

— trattamento della sostanze chimica in esame/sostanza di controllo prima della prova, se applicabile (ad esempio, riscaldamento, frantumazione);

— stabilità della sostanza chimica in esame, data limite di utilizzo, data della nuova analisi, se nota;

— condizioni di conservazione.

Mezzo disperdente:

— identificazione, concentrazione (ove pertinente), volume utilizzato;

— motivazione della scelta del mezzo.

Modello della barriera impermeabile in vitro e protocollo utilizzati, ivi compresa la precisione e affidabilità dimostrate

Condizioni sperimentali:

— descrizione dell'apparecchiatura e delle procedure di preparazione utilizzate;

— fonte e composizione della membrana impermeabile *in vitro* utilizzata;

— composizione e proprietà della soluzione d'indicatore;

— metodo di rilevamento;

— quantità della sostanza chimica in esame e delle sostanze di controllo;

— numero di repliche;

— descrizione e giustificazione del test di categorizzazione della scala temporale;

▼M8

— metodo di applicazione;

— tempi di osservazione.

— descrizione dei criteri di valutazione e classificazione impiegati;

— dimostrazione della competenza nell'esecuzione del metodo di prova prima del suo uso sistematico testando le sostanze chimiche per la verifica della competenza tecnica.

Risultati:

— presentazione sotto forma di tabella dei dati grezzi individuali ottenuti da ciascun campione di prova e di controllo per ogni replica;

— descrizioni di altri effetti osservati;

— classificazione ottenuta con riferimento al modello predittivo/ai criteri decisionali utilizzati.

Discussione dei risultati

Conclusioni

BIBLIOGRAFIA

(1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Fifth Revised Edition, UN New York and Genev, 2013. Disponibile qui: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html.

(2) Capitolo B.4 del presente allegato: Irritazione/corrosione cutanea acuta.

(3) Capitolo B.40 *bis* del presente allegato, Corrosione cutanea *in vitro*: test su un modello di epidermide umana ricostituita (RHE)

(4) Capitolo B.40 del presente allegato, Corrosione cutanea *in vitro*: Resistenza elettrica transcutanea (TER).

(5) OECD (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economici (OCSE)

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483-524.

(7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495.)

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.

▼**M8**

(9) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment (N. 34).

(10) OECD (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economici (OCSE) Disponibile qui: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

(11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, 96-97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (20 settembre 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Capitolo B.46 del presente allegato, Irritazione cutanea *in vitro*: metodo di prova su un modello di epidermide umana ricostituita. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Disponibile qui: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Disponibile qui: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) United Nations (UN) (2013). UN Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Model Regulations, 18th Revised Edition (Part, Chapter 2.8), UN, 2013. Disponibile qui: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

▼**M8**

Appendice

DEFINIZIONI

Accuratezza: grado di concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo di prova e i valori di riferimento accettati. Misura l'efficienza del metodo di prova e costituisce un aspetto della pertinenza. Il termine è spesso utilizzato come sinonimo di "concordanza" per indicare la percentuale di risultati corretti di un metodo di prova (9).

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Sistema di rilevamento chimico (CDS): sistema di misurazione visivo o elettronico che si avvale di una soluzione di indicatore che reagisce alla presenza di una sostanza chimica in esame (ad esempio con la modifica di un colorante indicatore di pH o di una combinazione di questi coloranti) che registra un cambiamento di colore in risposta alla presenza della sostanza in esame o evidenzia altri tipi di reazioni chimiche o elettrochimiche.

Concordanza: misura dell'efficacia del metodo di prova per i metodi che forniscono un risultato ordinabile in categorie; si tratta di un aspetto della pertinenza. Il termine è usato a volte come sinonimo di "accuratezza" ed è definito come la proporzione di tutte le sostanze chimiche in esame che sono correttamente classificate come positive o negative. La concordanza dipende strettamente dalla prevalenza di risultati positivi in tutti i tipi di sostanze chimiche in esame (9).

Sistema globale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche delle Nazioni Unite (GHS dell'ONU): sistema di classificazione delle sostanze chimiche (sostanze e miscele) secondo tipi standardizzati e livelli di rischio fisico, sanitario e ambientale, che elabora i relativi elementi di comunicazione, quali pittogrammi, avvertenze, indicazioni di pericolo, consigli di precauzioni e schede informative di sicurezza, per trasmettere informazioni sugli effetti avversi di dette sostanze a tutela delle persone (compresi datori di lavoro, lavoratori, trasportatori, consumatori e personale di pronto intervento) e dell'ambiente (1).

IATA: Approcci integrati in materia di prove e valutazioni (*Integrated Approaches to Testing and Assessment*).

Miscela: una miscela o una soluzione composta di due o più sostanze.

Sostanza monocostituente: sostanza, definita attraverso la sua composizione quantitativa, in cui un costituente principale è presente in percentuale pari ad almeno l'80 % (p/p).

Sostanza multicostituente: sostanza, definita attraverso la sua composizione quantitativa, in cui più costituenti principali sono presenti in concentrazione ≥ 10 % (p/p) e < 80 % (p/p). Una sostanza multicostituente è il risultato di un processo di fabbricazione. La differenza tra miscela e sostanza multicostituente è che una miscela è ottenuta attraverso la miscelazione di due o più sostanze senza che avvenga una reazione chimica. Una sostanza multicostituente è il risultato di una reazione chimica.

NC: Non corrosivo.

Standard di prestazione: standard, basati su un metodo di riferimento validato, che consentono di valutare la comparabilità di un metodo proposto che è simile sotto il profilo meccanicistico e funzionale. Detti standard comprendono: i) gli elementi essenziali del metodo di prova; ii) un elenco minimo di sostanze chimiche di riferimento scelte tra le sostanze utilizzate per dimostrare le prestazioni accettabili del metodo di prova validato; e iii) in funzione dei risultati ottenuti con il metodo di riferimento validato, i livelli comparabili di affidabilità e accuratezza che il metodo proposto dovrebbe ottenere quando viene valutato utilizzando l'elenco minimo di sostanze di riferimento (9).

▼**M8**

Pertinenza: descrizione del rapporto tra la prova e l'effetto studiato; indica se la prova è significativa e utile per uno scopo specifico. È il grado con cui la prova misura o prevede correttamente l'effetto biologico di interesse. La pertinenza comprende una valutazione dell'accuratezza (concordanza) di una prova (9).

Affidabilità: misura in cui l'esecuzione di un metodo di prova può essere riprodotta nel tempo all'interno dello stesso laboratorio o da laboratori diversi seguendo il medesimo protocollo. È valutata calcolando la riproducibilità intra-laboratorio e inter-laboratori (9).

Sensibilità: proporzione di tutte le sostanze chimiche positive/attive correttamente classificate dal metodo di prova. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di un metodo di prova (9).

Corrosione cutanea *in vivo*: il manifestarsi di lesioni irreversibili della pelle, vale a dire, necrosi visibile dell'epidermide e del derma, a seguito dell'applicazione della sostanza chimica di prova per non più di quattro ore. Gli effetti tipici della corrosione sono ulcere, sanguinamento, croste sanguinolente e, al termine di un periodo di osservazione di 14 giorni, depigmentazione cutanea dovuta all'effetto sbiancante, chiazze di alopecia e cicatrici. Per valutare le lesioni dubbie potrebbe essere necessario ricorrere a un esame istopatologico.

Specificità: proporzione di tutte le sostanze chimiche negative/inattive correttamente classificate dal metodo di prova. Misura l'accuratezza di un metodo di prova che produce risultati ordinabili in categorie ed è un elemento importante per valutare la pertinenza di un metodo di prova (9).

Sostanza: un elemento chimico e i suoi composti, allo stato naturale od ottenuti per mezzo di un procedimento di fabbricazione, compresi gli additivi necessari a mantenerne la stabilità e le impurezze derivanti dal procedimento utilizzato, ma esclusi i solventi che possono essere separati senza compromettere la stabilità della sostanza o modificarne la composizione.

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

UVCB: sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici.

▼M8

B.66. **SAGGI DI TRANSATTIVAZIONE *IN VITRO* TRAMITE TRASFEZIONE STABILE PER L'INDIVIDUAZIONE DI SOSTANZE AGONISTE E ANTAGONISTE DEI RECETTORI ESTROGENICI**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼M8

B.67. PROVE *IN VITRO* DI MUTAZIONE GENICA SU CELLULE DI MAMMIFERO UTILIZZANDO IL GENE TIMIDINA CHINASI

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 490 (2016). I metodi di prova vengono periodicamente riesaminati e rivisti alla luce dei progressi scientifici, delle esigenze in materia di regolamentazione, e di considerazioni relative al benessere degli animali. La prova sul linfoma di topo (MLA) e la prova TK6 con il locus timidina chinasi (TK) erano in origine contenute nel metodo di prova B.17. Successivamente il gruppo di lavoro degli esperti MLA dell'*International Workshop on Genotoxicity Testing* (IWGT) ha elaborato raccomandazioni armonizzate a livello internazionale per i criteri di accettazione delle prove e per l'interpretazione dei dati della prova MLA (1)(2)(3)(4)(5), che sono state inserite nel presente nuovo metodo di prova B.67. Il presente metodo di prova è elaborato per la prova MLA e, poiché usa anche il locus TK, anche per la prova TK6. La prova MLA è ampiamente usata a fini regolamentari, mentre la prova TK6 è stata usata molto meno frequentemente. Va osservato che, nonostante le similitudini fra gli endpoint, le due linee cellulari non sono intercambiabili e i programmi regolamentari possono esprimere validamente una preferenza per l'una o l'altra, a seconda di un particolare uso regolamentare. A titolo di esempio, la validazione della prova MLA ne ha dimostrato l'idoneità a rilevare non solo la mutazione genica, bensì anche la capacità di una sostanza chimica in esame di indurre danni strutturali a carico dei cromosomi. Il presente metodo di prova è parte integrante di una serie di metodi di prova sulla tossicologia genetica. Un documento contenente informazioni succinte sulle prove di tossicologia genetica dell'OCSE, comprensivo di un compendio delle modifiche recentemente apportate alla rispettiva linea guida è stato elaborato dall'OCSE (6).

2. Scopo della prova *in vitro* di mutazione genica su cellule di mammifero è identificare mutazioni geniche indotte da sostanze chimiche. Le linee cellulari utilizzate in queste prove misurano le mutazioni "in avanti" dei geni reporter, in particolare il gene endogeno timidina chinasi (*TK* per le cellule umane e *Tk* per le cellule di roditori, denominate collettivamente *TK* in questo metodo di prova). Il presente metodo di prova è destinato a essere usato con due linee cellulari: le cellule di linfoma di topo L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C (in generale denominate L5178Y) e le cellule linfoblastoidi umane TK6 (in generale denominate TK6). Sebbene le due linee cellulari differiscano a causa della loro origine, crescita cellulare, status del gene p53, ecc., le prove di mutazione genica *TK* possono essere effettuate in maniera simile su entrambi i tipi di cellule, come illustrato nel presente metodo di prova.

3. La natura autosomica ed eterozigote del gene timidina chinasi consente di individuare colonie vitali le cui cellule sono carenti dell'enzima timidina chinasi in seguito a una mutazione da $TK^{+/-}$ a $TK^{-/-}$. Tale carenza può risultare da fenomeni genetici che colpiscono il gene *TK*, compresi sia le mutazioni genetiche (mutazioni puntiformi, mutazioni per spostamento del sistema di lettura, piccole delezioni, ecc.) che i fenomeni cromosomici (ampie delezioni, riarrangiamenti cromosomici e ricombinazione mitotica). Questi ultimi fenomeni sono espressi come perdita di eterozigosi, ossia un cambiamento genetico comune dei geni soppressori dei tumori nell'oncogenesi umana. Teoricamente, nella prova MLA si può rilevare la perdita dell'intero cromosoma portante il gene *TK* che fa seguito al danneggiamento dell'elica e/o alla non disgiunzione mitotica. In effetti una combinazione di analisi citogenetica e molecolare mostra chiaramente che alcuni mutanti MLA TK sono il risultato di una non disgiunzione. Il peso dell'evidenza mostra tuttavia che le prove di mutazione genica *TK* non possono rilevare in modo affidabile gli aneugeni applicando i criteri standard di citotossicità (come descritto nel presente metodo di prova) e pertanto non è appropriato utilizzare tali metodi di prova per rilevare gli aneugeni (7) (8) (9).

▼M8

4. Nelle prove di mutazione genica *TK*, si generano due classi fenotipiche distinte di mutanti *TK*; i mutanti aventi una crescita normale che crescono allo stesso ritmo delle cellule eterozigoti TK e i mutanti aventi una crescita lenta che crescono con tempi di raddoppiamento prolungati. I mutanti a crescita normale e i mutanti a crescita lenta si riconoscono nella prova MLA come mutanti che producono colonie grandi e mutanti che producono colonie piccole e, nella prova TK6, come mutanti che producono colonie a comparsa precoce e mutanti che producono colonie a comparsa tardiva. La natura molecolare e citogenetica dei due tipi di mutanti (quelli che producono colonie grandi e quelli che producono colonie piccole nella prova MLA) è stata studiata in modo approfondito (8) (10) (11) (12) (13). La natura molecolare e citogenetica dei due tipi di mutanti TK6 a comparsa precoce e a comparsa tardiva è stata anch'essa ampiamente studiata (14) (15) (16) (17). I mutanti a crescita lenta di entrambi i tipi di cellule hanno subito danni genetici che comportano uno o più geni che si presumono responsabili di regolare la crescita presso il locus *TK*, il che determina tempi di raddoppiamento prolungati e la formazione di piccole colonie o a comparsa tardiva (18). La presenza di mutanti a crescita lenta è stata messa in relazione con sostanze chimiche che causano rilevanti cambiamenti strutturali a livello cromosomico. Le cellule i cui danni non riguardano il o i geni che si presumono responsabili di regolare la crescita presso il locus *TK* crescono a una velocità analoga a quella delle cellule parentali e diventano mutanti a crescita normale. L'induzione di mutanti principalmente a crescita normale è associata a sostanze chimiche che fungono principalmente da mutageni puntiformi. È quindi fondamentale conteggiare sia i mutanti a crescita lenta che quelli a crescita normale, al fine di recuperare tutti i mutanti e ottenere informazioni sul o sui tipi di danni (mutageni o clastogeni) indotti dalla sostanza chimica in esame (10) (12) (18) (19).

5. Il metodo di prova è organizzato in modo da fornire informazioni generali applicabili a entrambe le prove MLA e TK6 nonché orientamenti specializzati per le singole prove.

6. Le definizioni usate sono riportate nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

7. Le prove *in vitro* richiedono in generale l'uso di una fonte esogena di attivazione metabolica. Il sistema esogeno di attivazione metabolica non simula perfettamente le condizioni *in vivo*.

8. Occorre adoperarsi per evitare condizioni che porterebbero a falsi risultati positivi (vale a dire potenziali interazioni con il sistema di prova), non causati da un'interazione fra la sostanza chimica in esame e il materiale genetico della cellula; tali condizioni includono modifiche del pH o dell'osmolalità, un'interazione con i componenti del terreno di coltura (20) (21) o una eccessiva citotossicità (22)(23)(24). Per le prove MLA e TK6 è considerata eccessiva una citotossicità che superi i massimi livelli di citotossicità raccomandati definiti al paragrafo 28. Va inoltre osservato che le sostanze chimiche in esame analoghe della timidina o che si comportano come gli analoghi della timidina possono aumentare la frequenza dei mutanti mediante crescita selettiva dei mutanti spontanei di fondo durante il trattamento delle cellule e richiedono metodi di prova supplementari ai fini di un'adeguata valutazione (25).

9. Possono essere necessari adattamenti specifici di questo metodo di prova, non descritti in questa sede, per i nanomateriali di sintesi.

10. Prima di applicare il presente metodo di prova a una miscela per generare dati ai fini regolamentari previsti, si deve considerare se, e in caso affermativo, perché, esso possa fornire risultati adeguati a tale scopo. Tale verifica non è necessaria se la miscela viene sottoposta a prova in ottemperanza a un obbligo regolamentare.

▼M8

11. Le cellule mutanti carenti di attività enzimatica della timidina chinasi a causa della mutazione $TK^{+/-}$ —> $TK^{-/-}$ sono resistenti agli effetti citostatici dell'analogo pirimidinico trifluorotimidina (TFT). Le cellule capaci di produrre *TK* sono sensibili alla TFT, che provoca l'inibizione del metabolismo cellulare e arresta la divisione cellulare. Di conseguenza, le cellule mutanti sono in grado di proliferare in presenza di TFT e di formare colonie, mentre le cellule contenenti l'enzima TK non lo sono.

PRINCIPIO DELLA PROVA

12. Le cellule in sospensione sono esposte alla sostanza in esame, con e senza fonte esogena di attivazione metabolica (cfr. il paragrafo 19), per un tempo adeguato (cfr. il paragrafo 33), poi si allestiscono sub-culture per determinare la citotossicità e permettere l'espressione fenotipica prima della selezione dei mutanti. La citotossicità è determinata dalla crescita relativa totale (RTG - cfr. il paragrafo 25) per la prova MLA e dal tasso di sopravvivenza relativa (RS - cfr. il paragrafo 26) per la prova TK6. Le colture trattate sono mantenute nel terreno di coltura per un periodo sufficiente, specifico per ciascun tipo cellulare (cfr. il paragrafo 37), per permettere l'espressione fenotipica ottimale delle mutazioni indotte. Secondo l'espressione fenotipica, la frequenza dei mutanti è determinata mediante inseminazione di un numero noto di cellule in terreno contenente l'agente selettivo, per individuare le colonie mutanti, e in terreno non contenente l'agente selettivo, per determinare l'efficacia di clonazione (vitalità). Dopo un adeguato periodo di incubazione le colonie sono contate. La frequenza dei mutanti è calcolata sulla base del numero di colonie di mutanti corretto per l'efficienza di clonazione al momento della selezione dei mutanti.

DESCRIZIONE DEL METODO

Preparazioni

Cellule

13. Per la prova MLA: poiché il metodo di prova MLA è stato elaborato e caratterizzato dal ricorso alla sottolinea $TK^{+/-}$ -3.7.2C di cellule L5178Y, per la presente prova si deve utilizzare questa sottolinea specifica. La linea cellulare L5178Y è stata derivata da un linfoma timico indotto da metilcolantrene in un topo DBA-2 (26). Clive e colleghi hanno trattato le cellule L5178Y (indicate da Clive come $TK^{+/+}$ -3) con etilmetan sulfonato e hanno isolato un clone $TK^{-/-}$ (indicato come $TK^{-/-}$ -3.7), utilizzando bromodeossiuridina come agente selettivo. A partire dal clone $TK^{-/-}$ sono stati isolati e caratterizzati per essere utilizzati nella prova MLA un clone spontaneo $TK^{+/-}$ (indicato come $TK^{+/-}$ -3.7.2.) e un sottoclone (indicato come $TK^{+/-}$-3.7.2C) (27). Il cariotipo della linea cellulare è stato pubblicato (28)(29)(30)(31). Il numero modale dei cromosomi è 40. Vi è un cromosoma metacentrico (t12;13) che deve essere conteggiato come un cromosoma. Nel topo il locus *TK* è situato all'estremità distale del cromosoma 11. La linea cellulare L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C presenta mutazioni in entrambi gli alleli p53 e produce la proteina mutante p53 (32) (33). Si presume che la capacità di individuare danni su ampia scala sia riconducibile allo status p53 della linea cellulare $TK^{+/-}$-3.7.2C (17).

14. Per la prova TK6: si tratta di una linea cellulare linfoblastoide umana. La linea cellulare parentale consiste nella linea cellulare trasformata dal virus di Epstein-Barr WI-L2, in origine derivata da un soggetto maschio di cinque anni affetto da sferocitosi ereditaria. Il primo clone isolato, HH4, è stato mutagenizzato con ICR191 e si è generata una linea cellulare eterozigote *TK*, TK6 (34). Le cellule TK6 sono quasi diploidi e il cariotipo rappresentativo è 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Nell'uomo il locus *TK* è situato sul braccio lungo del cromosoma 17. La prova TK6 è una linea cellulare competente per il gene p53, in quanto presenta una sequenza p53 di tipo casuale su entrambi gli alleli ed esprime unicamente la proteina p53 di tipo casuale (36).

▼M8

15. In entrambe le prove MLA e TK6, quando si costituisce o si ricostituisce una popolazione di cellule, si raccomanda al laboratorio che esegue la prova di garantire l'assenza di contaminazione da *Mycoplasma*, di procedere al cariotipaggio delle cellule o colorare i cromosomi che presentano il locus *TK* e di controllare i tempi di raddoppiamento della popolazione. Occorre stabilire la durata normale del ciclo cellulare delle linee cellulari utilizzate nel laboratorio di prova, che deve essere coerente con le caratteristiche cellulari pubblicate (16) (19) (37). Tale popolazione madre va conservata a -150 °C o a temperatura inferiore e va utilizzata per preparare tutti gli stock cellulari di lavoro.

16. Prima di costituire un ampio numero di stock di lavoro crioconservati o appena prima di utilizzarli in un esperimento, la coltura può dover essere ripulita delle cellule mutanti preesistenti [salvo nel caso in cui la frequenza dei mutanti (MF) nel solvente di controllo si trovi già entro l'intervallo accettabile, cfr. tabella 2 per la prova MLA)]. Questo avviene utilizzando metotressato (aminopterina) per scartare le cellule carenti in TK e aggiungendo alla coltura timidina, ipoxantina e glicina (L5178Y) o 2'-deossicitidina (TK6) al fine di garantire la crescita ottimale delle cellule competenti per la TK (19)(38)(39) (e (40) per la prova TK6). Ai paragrafi (19)(31)(37)(39)(41) figurano le indicazioni generali relative alle buone prassi per il mantenimento delle colture cellulari nonché raccomandazioni specifiche relative alle cellule L5178Y e TK6. Per i laboratori che necessitano di popolazioni cellulari madri per avviare la prova MLA o TK6 o che devono ottenere nuove popolazioni madri, è disponibile una banca di cellule qualificata (37).

Terreni e condizioni di coltura

17. Per entrambe le prove, le colture vanno mantenute in terreni di coltura e condizioni di incubazione (ad es. recipienti di coltura, atmosfera umidificata al 5 % di CO_2, temperatura di incubazione di 37 °C) adeguati. Le colture cellulari sono sempre mantenute in condizioni che garantiscano una crescita in fase esponenziale. È particolarmente importante che i terreni e le condizioni di coltura siano scelti in modo da garantire la crescita ottimale delle cellule durante il periodo di espressione e di clonazione delle cellule mutanti e non mutanti. Nelle prove MLA e TK6 è altresì importante che le condizioni di coltura garantiscano una crescita ottimale dei mutanti TK delle grandi colonie/a comparsa precoce come delle piccole colonie/a comparsa tardiva. Ai paragrafi (19)(31)(38)(39)(40)(42) sono reperibili maggiori particolari relativi alla coltura, compresa l'esigenza di inattivare termicamente il siero di cavallo se si utilizza il terreno di coltura RPMI nella selezione dei mutanti.

Preparazione delle colture

18. Le cellule provengono da colture primarie, sono inseminate in un terreno di coltura ad una densità tale che le colture in sospensione proseguiranno la loro crescita esponenziale durante le fasi di trattamento ed espressione.

Attivazione metabolica

19. Se si utilizzano cellule L5178Y e TK6 in quanto prive di un'adeguata capacità di attivazione metabolica endogena, si deve ricorrere a sistemi di attivazione metabolica esogeni. Il sistema più comunemente usato, raccomandato in tutti i casi salvo alternativa motivata, è una frazione post-mitocondriale integrata di cofattore (S9), prelevata dal fegato di roditori (in generale ratti) trattati con induttori enzimatici come Aroclor 1254 (43) (44) (45) o con una combinazione di fenobarbitone e β-naftoflavone (46) (47) (48) (49) (50) (51). Quest'ultima combinazione è conforme alla convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti (52) e ha dimostrato di essere tanto efficace quanto l'Aroclor 1254 nell'indurre ossidasi a

▼M8

funzione mista (45) (46) (47) (48) (49). La frazione S9 viene in generale usata a concentrazioni comprese tra 1-2 % (v/v) ma può aumentare fino al 10 % (v/v) nel terreno di coltura finale. La scelta del tipo e della concentrazione del sistema di attivazione metabolica esogena o dell'induttore metabolico usato può dipendere dalla classe delle sostanze chimiche in esame.

Preparazioni della sostanza chimica in esame

20. Le sostanze chimiche in esame solide devono essere preparate in adeguati solventi e, se necessario, diluite prima del trattamento delle cellule (cfr. il paragrafo 21). Le sostanze chimiche liquide in esame possono essere aggiunte direttamente alla coltura e/o diluite prima del trattamento del sistema di prova. Le sostanze chimiche in esame gassose o volatili devono essere sottoposte alla prova modificando adeguatamente i protocolli standard (trattamento in recipienti di coltura ermetici) (53) (54) (55). Devono essere utilizzati preparati della sostanza chimica approntati immediatamente prima del trattamento, salvo qualora siano disponibili dati sulla sua stabilità che dimostrino che la conservazione è accettabile.

CONDIZIONI DI PROVA

Solventi

21. La scelta del solvente deve favorire l'ottimizzazione della solubilità della sostanza chimica in esame, senza nuocere alla conduzione del metodo di prova (ad esempio influenzando la crescita cellulare), compromettere l'integrità della sostanza chimica in esame, reagire con recipienti di coltura o pregiudicare il sistema di attivazione metabolica. Si raccomanda di prendere in considerazione in primo luogo, se possibile, l'uso di un solvente acquoso (o terreno di coltura). Solventi il cui uso è consolidato sono l'acqua e il dimetilsolfossido. In generale è opportuno che i solventi organici non superino l'1 % (v/v) e quelli acquosi (soluzione fisiologica o acqua) il 10 % (v/v) nel terreno di coltura finale. L'uso di solventi poco noti (ad esempio, etanolo o acetone) è ammesso purché suffragato da dati che ne provino la compatibilità con le sostanze chimiche in esame e l'assenza di tossicità genetica alla concentrazione utilizzata. In assenza di tali dati, è importante includere controlli non trattati (cfr. l'appendice 1, definizioni) per dimostrare che il solvente scelto non induce effetti nocivi o mutageni.

MISURAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ E SCELTA DELLE CONCENTRAZIONI DI TRATTAMENTO

22. Nel determinare la concentrazione più elevata della sostanza chimica in esame, occorre evitare le concentrazioni che hanno la capacità di produrre falsi risultati positivi, come quelle che causano eccessiva citotossicità (cfr. il paragrafo 28), precipitazione nel terreno di coltura (cfr. il paragrafo 29) o variazioni marcate del pH od osmolalità (cfr. il paragrafo 8). Se la sostanza chimica in esame provoca un'alterazione marcata del pH del terreno al momento della sua aggiunta, è possibile adeguare il pH mediante l'azione tampone del terreno di trattamento finale in modo da evitare falsi risultati positivi e da mantenere condizioni di coltura appropriate.

23. La scelta della concentrazione si basa sulla citotossicità e su altre considerazioni (cfr. i paragrafi 27-30). Mentre la valutazione della citotossicità in una prova iniziale può essere utile per definire meglio le concentrazioni da utilizzare nell'esperimento principale, non è necessario condurre una prova iniziale. Anche se si effettua una valutazione iniziale della citotossicità, nella prova principale è ancora richiesta la misurazione della citotossicità di ciascuna coltura. Se si effettuano esperimenti per determinare gli intervalli di dose, essi dovrebbero interessare un'ampia gamma di concentrazioni e possono essere conclusi al giorno 1 dopo il trattamento o proseguiti attraverso l'espressione del giorno 2 e la selezione dei mutanti (se risulta che le concentrazioni utilizzate sono appropriate).

▼M8

24. La citotossicità va determinata per ciascuna coltura di prova e di controllo: i metodi di prova per le prove MLA (2) e TK6 (15) sono definiti da prassi concordate a livello internazionale.

25. Per entrambe le versioni (gel di agarosio e microtitolazione) della prova MLA: la citotossicità va valutata mediante la crescita relativa totale (RTG), in origine definita da Clive e Spector nel 1975 (2). Questa misurazione include la crescita in sospensione relativa (RSG: coltura di prova e coltura di controllo con solvente) durante il trattamento delle cellule, il tempo di espressione e l'efficienza relativa di clonazione (RCE: coltura di prova e coltura di controllo con solvente) al momento della selezione dei mutanti (2). Va osservato che la RSG include le eventuali perdite di cellule che si verificano nella coltura di prova durante il trattamento (cfr. l'appendice 2 per la formula).

26. Per la prova TK6: la citotossicità va valutata per mezzo del tasso di sopravvivenza relativa (RS), ossia l'efficienza di clonazione delle cellule piastrate subito dopo il trattamento, adeguata per le eventuali perdite di cellule durante il trattamento, in base alla conta cellulare, rispetto ai controlli negativi (assegnata una sopravvivenza del 100 %) (cfr. l'appendice 2 per la formula).

27. Si usino almeno quattro concentrazioni di prova (senza contare i controlli positivi e i controlli con solvente) che soddisfano i criteri di accettabilità (citotossicità adeguata, numero di cellule, ecc.). Sebbene sia consigliabile l'utilizzo di colture doppie, per ciascuna concentrazione di prova si possono utilizzare colture replicate o uniche. I risultati ottenuti con colture replicate con una determinata concentrazione devono essere riportati separatamente ma possono essere aggregati per l'analisi dei dati (55). Per le sostanze chimiche in esame la cui citotossicità è bassa o nulla, sono in generale adeguati intervalli di concentrazione di un fattore di circa 2 a 3. In caso di citotossicità, le concentrazioni di prova selezionate devono coprire l'intervallo di citotossicità a partire dai valori che producono citotossicità come descritto al paragrafo 28 e che include le concentrazioni alle quali si riscontra una citotossicità modesta o nulla. Molte sostanze chimiche in esame presentano curve di concentrazione-risposta a forte pendenza e, per coprire l'intero intervallo di citotossicità o per valutare la concentrazione-risposta in dettaglio, può essere necessario utilizzare concentrazioni più ravvicinate e più di quattro concentrazioni, in particolare nei casi in cui è necessario ripetere l'esperimento (cfr. il paragrafo 70). L'utilizzo di più di quattro concentrazioni può essere particolarmente importante quando si utilizzano colture uniche.

28. Se la concentrazione massima è basata sulla citotossicità, la concentrazione massima deve mirare a realizzare un tasso di RTG compreso fra 20 e 10 % per la prova MLA e un tasso di RS fra 20 e 10 % per la prova TK6 (paragrafo 67).

29. Per le sostanze chimiche in esame scarsamente solubili che non sono citotossiche a concentrazioni inferiori alla concentrazione insolubile più bassa, la concentrazione più elevata analizzata dovrebbe presentare una torbidità o un precipitato visibile ad occhio nudo o con un microscopio invertito alla fine del trattamento con la sostanza chimica in esame. Anche se la citotossicità si verifica a concentrazioni superiori a quella minima insolubile, è indicato effettuare la prova a una sola concentrazione che produce torbidità o un precipitato visibile, perché il precipitato può falsare gli effetti. Poiché le prove MLA e TK6 utilizzano colture in sospensione, che produce un precipitato, occorre assicurarsi in particolare che quest'ultimo non interferisca con la conduzione della sperimentazione. Può essere utile anche valutare la solubilità nel terreno di coltura prima della prova.

▼M8

30. Se non si osserva una citotossicità limitante o si rileva la presenza di un precipitato, la concentrazione massima di prova dovrebbe essere pari a 10 mM, 2 mg/ml or 2 µl/ml, (si scelga il valore più basso) (57) (58). Quando la composizione della sostanza chimica in esame non è definita, ad esempio nel caso di sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici (ossia sostanze di composizione sconosciuta o variabile, UVCB), prodotti estratti dall'ambiente, ecc., può essere necessario aumentare la concentrazione massima (ad es. 5 mg/ml) in assenza di citotossicità sufficiente, per aumentare la concentrazione di ciascun componente. Va tuttavia rilevato che tali requisiti possono essere diversi per i prodotti farmaceutici per uso umano (59).

Controlli

31. Per ciascuna condizione di prova si effettuano anche controlli negativi concomitanti (cfr. il paragrafo 21), consistenti nel solo solvente nel terreno di trattamento; i controlli vanno trattati come le colture di trattamento.

32. I controlli positivi concomitanti sono necessari per dimostrare la capacità del laboratorio di individuare mutageni alle condizioni del protocollo di prova, l'efficacia del sistema di attivazione metabolica esogena, se del caso, nonché un'adeguata rilevazione dei mutanti *TK*, sia in piccole colonie/a comparsa tardiva, sia in grandi colonie/a comparsa precoce. Esempi di controlli positivi sono indicati nella tabella 1 in appresso. Sostanze alternative possono essere usate per i controlli positivi, se necessario. Poiché le prove di genotossicità *in vitro* su cellule di mammifero sono sufficientemente standardizzate per i trattamenti concomitanti di breve durata (3-4 ore) effettuati con e senza attivazione metabolica per la stessa durata di trattamento, l'uso dei controlli positivi può essere limitato a un mutageno che richiede attivazione metabolica. In questo caso, questa sola risposta in un controllo positivo dimostrerà sia l'attività del sistema di attivazione metabolica che la capacità di risposta del sistema di prova. Se utilizzato, il trattamento a lungo termine (ossia 24 ore senza S9) richiede tuttavia l'esecuzione di un proprio controllo positivo, in quanto la durata del trattamento differisce da quella della prova con attivazione metabolica. Ciascun controllo positivo va utilizzato con una o più concentrazioni che in generale danno luogo a un aumento riproducibile e individuabile rispetto al valore di fondo per dimostrare la sensibilità del sistema sperimentale e la risposta non può essere compromessa da una citotossicità superiore ai limiti stabiliti nel presente metodo di prova (cfr. il paragrafo 28).

Tabella 1

Sostanze chimiche di riferimento raccomandate per la valutazione della competenza dei laboratori e per la selezione dei controlli positivi

Categoria	Sostanza	N. CAS
1. Mutageni attivi senza attivazione metabolica		
	Metansolfonato di metile	66-27-3
	Mitomicina C	50-07-7
	4-Nitrochinolina-N–ossido	56-57-5
2. Mutageni che richiedono attivazione metabolica		
	Benzo(a)pirene	50-32-8
	Ciclofosfamide (monoidrato)	50-18-0 (6055-19-2)
	7,12-Dimetilbenzantracene	57-97-6
	3-Metilcolantrene	56-49-5

▼M8

PROCEDURA

Trattamento con la sostanza chimica in esame

33. Le cellule in proliferazione sono trattate con la sostanza chimica in esame in presenza e in assenza di un sistema di attivazione metabolica. L'esposizione deve protrarsi per un periodo adeguato (si considerano di norma adeguate 3-4 ore). Va tuttavia rilevato che tali requisiti possono essere diversi per i prodotti farmaceutici per uso umano (59). Per la prova MLA, nei casi in cui il trattamento di breve durata produca risultati negativi e in assenza di informazioni che indichino l'esigenza di un trattamento più lungo [ad es. analoghi nucleosidici, sostanze chimiche scarsamente solubili, (5) (59)], va presa in considerazione la conduzione della prova con un trattamento più lungo, ossia 24 ore senza S9.

34. Il numero minimo di cellule utilizzate per ciascuna coltura di prova (di controllo e trattate) in ogni fase della prova è basata sulla frequenza dei mutanti spontanei. Un orientamento generale è trattare e preparare sub-colture di un numero sufficiente di cellule per mantenere almeno 10 ma idealmente 100 mutanti spontanei in ciascuna coltura sperimentale in tutte le fasi della prova (trattamento, espressione fenotipica e selezione dei mutanti) (56).

35. Per la prova MLA la frequenza accettabile dei mutanti spontanei raccomandata è compresa fra 35-140 × 10^{-6} (gel di agarosio) e 50-170 × 10^{-6} (microtitolazione) (cfr. tabella 2). Per ottenere almeno 10 e idealmente 100 mutanti spontanei che sopravvivano al trattamento per ciascuna coltura di prova, è necessario trattare almeno 6 × 10^{6} cellule. Trattare questo numero di cellule e mantenere un numero di cellule sufficiente durante l'espressione e la clonazione per la selezione dei mutanti fornisce un numero sufficiente di mutanti spontanei (10 o più) in tutte le fasi della prova, anche per le colture trattate a concentrazioni con il 90 % di citotossicità (misurata da un RTG del 10 %) (19)(38)(39).

36. Per la prova TK6, la frequenza dei mutanti spontanei di norma è compresa fra 2 e 10 × 10^{-6}. Per ottenere almeno 10 mutanti spontanei che sopravvivano al trattamento per ciascuna coltura, è necessario trattare almeno 20 × 10^{6} cellule. Trattare un tale numero di cellule fornisce un numero sufficiente di mutanti spontanei (10 o più) anche per le colture trattate a concentrazioni che causano il 90 % di citotossicità durante il trattamento (RS 10 %). Inoltre durante il periodo di espressione per la selezione dei mutanti va coltivato e piastrato un numero sufficiente di cellule (60).

Tempo dell'espressione fenotipica e misurazione della citotossicità e della frequenza dei mutanti

37. Alla fine del periodo di trattamento le cellule sono coltivate per un tempo definito per consentire l'espressione fenotipica quasi ottimale delle mutazioni neoindotte; specifica di ciascuna linea cellulare. Per la prova MLA, il periodo di espressione fenotipica è di 2 giorni. Per la prova TK6, il periodo di espressione fenotipica è di 3-4 giorni. Se si utilizza un periodo di trattamento di 24 ore, il periodo di espressione inizia alla fine del trattamento.

38. Durante il periodo di espressione fenotipica le cellule sono conteggiate con cadenza giornaliera. Per la prova MLA le conte giornaliere delle cellule sono utilizzate per calcolare la crescita in sospensione quotidiana (SG). In seguito al periodo di espressione di 2 giorni, le cellule sono sospese nel terreno di coltura con e senza agente selettivo per determinare rispettivamente il numero dei mutanti (piastre di selezione) e l'efficienza di clonazione (piastre di vitalità). Per la prova MLA esistono due metodi ugualmente accettabili per clonare la selezione dei mutanti: il primo si avvale del gel di agarosio e l'altro utilizza un terreno di coltura liquido in piastre a 96 pozzetti (19) (38) (39). La clonazione nella prova TK6 è condotta utilizzando terreni di coltura liquidi e piastre a 96 pozzetti (16).

▼M8

39. La trifluorotimidina (TFT) è l'unico agente selettivo raccomandato per i mutanti *TK* (61).

40. Per la prova MLA, le piastre di agarosio e le piastre di microtitolazione sono sottoposte a conta dopo un'incubazione di 10-12 giorni. Per la prova TK6, le colonie nelle piastre di microtitolazione sono conteggiate dopo 10-14 giorni per i mutanti a comparsa precoce. Al fine di recuperare i mutanti TK6 a crescita lenta (comparsa tardiva), è necessario rialimentare le cellule con terreno di coltura e TFT, previa conta dei mutanti a comparsa precoce e quindi incubare le piastre per 7-10 giorni supplementari (62). Cfr. i paragrafi 42 e 44 per una discussione relativa all'enumerazione dei mutanti *TK* a crescita lenta e normale.

41. Nell'appendice 2 sono riportati i calcoli appropriati per le due prove, compresi i due metodi (gel di agarosio e microtitolazione) per la prova MLA. Per il metodo del gel di agarosio della prova MLA, si conteggiano le colonie e si adegua il numero di mutanti per l'efficienza di clonazione per calcolare una MF. Per la versione a microtitolazione delle prove MLA e TK6, l'efficienza di clonazione di entrambe le piastre di selezione ed efficienza di clonazione è determinata secondo la distribuzione di Poisson (63). La MF è calcolata a partire da queste due efficienze di clonazione.

Caratterizzazione della colonia mutante

42. Per la prova MLA, se la sostanza chimica in esame è positiva (cfr. i paragrafi 62 e 63), la caratterizzazione per dimensione o crescita della stessa deve essere effettuata su almeno una delle colture trattate (in generale quella con la concentrazione positiva più alta) nonché sui controlli negativi e positivi. Se la sostanza chimica in esame è negativa (cfr. il paragrafo 64), la caratterizzazione della colonia mutante va effettuata sui controlli negativi e positivi. Per il metodo della microtitolazione della prova MLA, una piccola colonia di mutanti è definita come quella che copre meno del 25 % del diametro del pozzetto e una grande colonia di mutanti come quella che copre oltre il 25 % del diametro del pozzetto. Per la versione con gel di agarosio, si utilizza un contatore di colonie automatico per conteggiare le colonie di mutanti e determinare la dimensione della colonia. Gli approcci alla determinazione della dimensione della colonia sono illustrati in dettaglio nella letteratura scientifica (19)(38)(40). La caratterizzazione della colonia nei controlli negativi e positivi è necessaria per dimostrare che gli studi sono stati adeguatamente condotti.

43. La sostanza chimica in esame non può essere determinata come negativa se i mutanti di entrambe le colonie, grandi e piccole, non sono adeguatamente rilevati nel controllo positivo. La caratterizzazione della colonia può essere utilizzata per ottenere informazioni generali relative alla capacità della sostanza chimica in esame di indurre mutazioni puntiformi e/o fenomeni cromosomici (paragrafo 4).

44. TK6: i mutanti a crescita normale e lenta si differenziano per il tempo di incubazione (cfr. il paragrafo 40). Per la prova TK6 in generale si conteggiano sia i mutanti a comparsa precoce, sia quelli a comparsa tardiva, per tutte le colture, compresi i controlli negativi e positivi. La caratterizzazione della colonia nei controlli negativi e positivi è necessaria per dimostrare che gli studi sono stati adeguatamente condotti. La sostanza chimica in esame non può essere determinata come negativa se i mutanti di entrambe le colonie a comparsa precoce e tardiva non sono adeguatamente rilevati nel controllo positivo. La caratterizzazione della colonia può essere utilizzata per ottenere informazioni generali relative alla capacità della sostanza chimica in esame di indurre mutazioni puntiformi e/o fenomeni cromosomici (paragrafo 4).

▼M8

Competenza del laboratorio

45. Al fine di dimostrare una sufficiente esperienza con un metodo di prova prima di utilizzarlo regolarmente, il laboratorio deve aver effettuato una serie di esperienze con sostanze di riferimento positive che agiscono mediante meccanismi differenti (almeno una con attivazione metabolica e una senza attivazione metabolica, con sostanze selezionate dalle sostanze chimiche elencate nella tabella 1) e con vari controlli negativi (comprese colture non trattate e diversi solventi/mezzi disperdenti). Le risposte dei controlli positivi e negativi devono essere coerenti con la letteratura scientifica. Questo requisito non si applica ai laboratori che hanno già maturato un'esperienza, vale a dire che dispongono di una banca di dati storici quale definita ai paragrafi 47-50. Per la prova MLA, i valori ottenuti per i controlli negativi e positivi devono essere coerenti con le raccomandazioni dell'*International Workshop on Genotoxicity Testing* (IWGT) (cfr. tabella 2).

46. Una selezione di sostanze chimiche utilizzate come sostanze di controllo positivo (cfr. tabella 1) deve essere verificata con trattamenti di breve e lunga durata (se si utilizzano trattamenti lunghi) in assenza attivazione metabolica, e anche con trattamenti brevi in presenza di attivazione metabolica, allo scopo di dimostrare che il laboratorio dispone della competenza necessaria per individuare le sostanze chimiche mutagene, determinare l'efficacia del sistema di attivazione metabolica e dimostrare l'adeguatezza delle condizioni di crescita delle cellule durante il trattamento, l'espressione fenotipica e la selezione dei mutanti nonché dei metodi di conteggio. Occorrerà definire un intervallo di concentrazione delle sostanze selezionate che consenta di ottenere aumenti riproducibili e correlati alla concentrazione rispetto ai valori di fondo allo scopo di dimostrare la sensibilità e l'intervallo dinamico del sistema di prova.

Dati storici di controllo

47. Il laboratorio deve stabilire:

— un intervallo e una distribuzione dei controlli positivi storici;

— un intervallo e una distribuzione dei controlli negativi storici (non trattati, con solvente).

48. Al momento della prima acquisizione di dati per stabilire la distribuzione dei controlli negativi storici, i dati dei controlli negativi concomitanti devono essere coerenti con i dati pubblicati. Con l'aumento dei dati sperimentali aggiunti alla distribuzione dei controlli, i controlli negativi concomitanti dovrebbero idealmente situarsi entro i limiti di tale controllo al 95 % di tale distribuzione (64) (65).

49. La banca dati dei controlli negativi storici del laboratorio deve inizialmente essere costituita con un minimo di 10 esperimenti ma preferibilmente con almeno 20 esperimenti svolti in condizioni sperimentali analoghe. I laboratori devono utilizzare metodi di controllo della qualità, quali diagrammi di controllo (ad esempio carte C o carte X medio (65)), per rilevare la variabilità dei loro dati di controllo positivi e negativi e dimostrare che la metodologia è "sotto controllo" nel laboratorio (66). Ulteriori dettagli e raccomandazioni su come sviluppare e utilizzare i dati storici sono reperibili nella letteratura scientifica (64).

50. I dati dei controlli negativi consistono nelle frequenze di mutanti da un'unica coltura o preferibilmente da colture replicate, come descritto al paragrafo 27. I controlli negativi concomitanti dovrebbero idealmente situarsi entro i limiti di tale controllo al 95 % della distribuzione della banca dati dei controlli negativi storici del laboratorio. Se i dati dei controlli negativi si situano al di fuori del limite di controllo al 95 %, la loro inclusione nella distribuzione dei controlli storici può essere accettata a condizione che tali dati non siano valori erratici estremi, che sia provato che il sistema di prova è "sotto controllo" (cfr. il paragrafo 49) e che non vi sono stati problemi tecnici o errori umani.

▼M8

51. Qualsiasi modifica del protocollo sperimentale deve essere valutata in termini di coerenza dei dati con le banche dati storiche esistenti del laboratorio. Eventuali notevoli incoerenze devono tradursi nella creazione di una nuova banca dati storica sui controlli.

DATI E RELAZIONE

Presentazione dei risultati

52. La presentazione dei dati per entrambe le prove MLA e TK6 deve includere, sia per le colture trattate che per quelle di control4lo, i dati necessari ai fini del calcolo della citotossicità (rispettivamente RTG o RS) e le frequenze dei mutanti, come indicato oltre.

53. Per la prova MLA, per ciascuna coltura si indicano i dati relativi ai tassi RSG, RTG, l'efficienza di clonazione al momento della selezione dei mutanti e il numero di colonie di mutanti (gel di agarosio) o il numero di pozzetti vuoti (microtitolazione). La MF deve essere espressa come il numero delle cellule mutanti per milione di cellule sopravvissute. Se la risposta è positiva, per almeno una concentrazione della sostanza chimica in esame (in generale la concentrazione positiva più elevata) si indicano le MF delle colonie piccole e grandi (e/o la percentuale della MF totale) nonché i controlli negativi e positivi. In caso di risposta negativa, si indicano le MF delle colonie piccole e grandi per i controlli nativi e positivi.

54. Per la prova TK6, per il tasso di RS si indicano i dati relativi a ciascuna coltura, l'efficienza di clonazione al momento della selezione dei mutanti e il numero di pozzetti vuoti per i mutanti a comparsa precoce e quelli a comparsa tardiva. La MF va espressa come numero di cellule mutanti per numero di cellule sopravvissute e include la MF totale nonché la MF (e/o la percentuale della MF totale) dei mutanti a comparsa precoce e tardiva.

Criteri di accettabilità

55. Per entrambe le prove MLA e TK6, i seguenti criteri devono essere soddisfatti prima di determinare i risultati complessivi di una specifica sostanza chimica in esame:

— sono state applicate due condizioni sperimentali (trattamento di breve durata con e senza attivazione metabolica, cfr. il paragrafo 33), salvo nel caso in cui una sia abbia prodotto risultati positivi.

— Deve essere possibile analizzare un numero adeguato di cellule e concentrazioni (cfr. i paragrafi 27, 34-36).

— I criteri di selezione della concentrazione massima sono coerenti con quelli descritti ai paragrafi 28-30.

Criteri di accettabilità per i controlli positivi e negativi

56. L'analisi del gruppo di lavoro di esperti MLA dell'IWGT condotta su un'ingente mole di dati MLA ha permesso di raggiungere il consenso internazionale relativamente ai criteri specifici di accettabilità della prova MLA (1)(2)(3)(4)(5). Il presente metodo di prova fornisce pertanto raccomandazioni specifiche per determinare l'accettabilità dei controlli negativi e positivi nonché per valutare i risultati della singola sostanza nella prova MLA. La prova TK6 dispone di una banca dati molto più ristretta e non è stata sottoposta alla valutazione di un gruppo di lavoro.

▼M8

57. Per la prova MLA, in ciascuna sperimentazione si valuta se il controllo non trattato/con solvente soddisfa i criteri di accettazione del gruppo di lavoro MLA dell'IWGT ((4) e tabella 2, oltre) relativamente a: 1) MF (si osservi che i valori MF ritenuti accettabili dall'IWGT sono diversi per le versioni con gel di agarosio e microtitolazione della prova MLA), 2) l'efficienza di clonazione (CE) al momento della selezione dei mutanti e 3) la crescita in sospensione (SG) per il controllo con solvente (cfr. l'appendice 2 per le formule).

Tabella 2

Criteri di accettabilità per la prova MLA

Parametro	Metodo del gel di agarosio	Metodo della microtitolazione
Frequenza dei mutanti	$35 – 140 \times 10^{-6}$	$50 – 170 \times 10^{-6}$
Efficienza di clonazione	65 – 120 %	65 – 120 %
Crescita in sospensione	Fattore 8 – 32 (trattamento di 3-4 ore) Fattore 32 – 180 (trattamento di 24 ore, se effettuato)	Fattore 8 – 32 (trattamento di 3-4 ore) Fattore 32 – 180 (trattamento di 24 ore, se effettuato)

58. Per la prova MLA, ciascuna prova deve anche valutare se il o i controlli positivi soddisfano almeno uno dei due criteri di accettazione elaborati dal gruppo di lavoro dell'IWGT:

— il controllo positivo deve dimostrare un incremento assoluto della MF totale, ossia un incremento superiore ai mutanti spontanei di fondo [MF indotta, IMF] di almeno 300×10^{-6}. Almeno il 40 % dell'IMF deve rispecchiarsi nella MF della piccola colonia.

— Il controllo positivo presenta un incremento di MF nella piccola colonia di almeno 150×10^{-6} rispetto a quanto osservato nel controllo concomitante non trattato/con solvente (IMF della piccola colonia pari a 150×10^{-6}).

58. Per una prova TK6, la prova è ritenuta accettabile se il controllo negativo concomitante è considerato accettabile per essere aggiunto nella banca dati sui controlli negativi storici di laboratorio come descritto ai paragrafi 48-49. Inoltre, i controlli positivi concomitanti (cfr. il paragrafo 32) devono produrre risposte compatibili con quelle generate nella banca dati dei controlli positivi storici e produrre un aumento statisticamente significativo rispetto al controllo negativo concomitante.

60. Per entrambe le prove il limite superiore della citotossicità osservata nella coltura di controllo positiva deve essere uguale a quello delle colture sperimentali, ossia, il tasso RTG/RS non deve essere inferiore al 10 %. È sufficiente utilizzare una concentrazione unica (o una delle concentrazioni delle colture di controllo positivo se si utilizza più di una concentrazione) per dimostrare che i criteri di accettazione del controllo positivo sono soddisfatti. Inoltre, la MF del controllo positivo deve situarsi nell'intervallo accettabile stabilito per il laboratorio.

Analisi e interpretazione dei risultati

61. Per la prova MLA, il gruppo di lavoro *Mouse Lymphoma Expert* dell'IWGT ha condotto un importante lavoro sulla rilevanza biologica e i criteri di risposta positiva (4). Pertanto il presente metodo di prova fornisce raccomandazioni specifiche per interpretare i risultati della prova MLA sulla

▼M8

sostanza chimica (cfr. i paragrafi 62-64). La prova TK6 dispone di una banca dati molto più ristretta e non è stata sottoposta alla valutazione di un gruppo di lavoro. Le raccomandazioni per interpretare i dati della prova TK6 sono quindi fornite in termini più generali (cfr. i paragrafi 65-66). Le raccomandazioni supplementari si applicano a entrambe le prove (cfr. i paragrafi 67-71).

MLA

62. Si raccomanda di adottare un approccio volto a definire le risposte positive e negative per assicurare che l'incremento della MF sia biologicamente rilevante. Anziché l'analisi statistica utilizzata in generale per altre prove, esso si fonda sull'uso di una frequenza dei mutanti indotta (ossia un incremento della MF superiore al controllo concomitante) predefinita, designata come "fattore di valutazione globale" (*Global Evaluation Factor*, GEF) e basata sull'analisi della distribuzione dei dati relativi alla MF del controllo negativo ottenuti dai laboratori partecipanti (4). Per la versione con gel di agarosio della prova MLA, il GEF è 90×10^{-6} e per la versione con microtitolazione della prova MLA il GEF è 126×10^{-6}.

63. A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è considerata chiaramente positiva se, in una qualsiasi delle condizioni sperimentali esaminate (cfr. il paragrafo 33), l'incremento della MF superiore al fondo concomitante è superiore al valore GEF e l'incremento è correlato alla concentrazione (ad es. mediante un test di tendenza). La sostanza chimica in esame è quindi ritenuta in grado di indurre mutazioni nel sistema di prova.

64. A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è considerata chiaramente negativa se, in una qualsiasi delle condizioni sperimentali esaminate (cfr. il paragrafo 33), non risulta una risposta correlata alla concentrazione o se l'incremento della MF non è superiore al valore GEF. La sostanza chimica in esame è quindi ritenuta non in grado di indurre mutazioni nel sistema di prova.

TK6

65. A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è considerata chiaramente positiva se, in una qualsiasi delle condizioni sperimentali esaminate (cfr. il paragrafo 33):

— almeno una delle concentrazioni di prova presenta un aumento statisticamente significativo rispetto al controllo negativo concomitante;

— un metodo adeguato di analisi della tendenza evidenzia che l'aumento è collegato alla dose (cfr. il paragrafo 33);

— vi sono risultati che non rientrano nella distribuzione dei dati dei controlli negativi storici (ad esempio limite di controllo al 95 % di una distribuzione di Poisson; cfr. il paragrafo 48).

Se tutti i criteri sono soddisfatti, la sostanza chimica in esame è ritenuta in grado di indurre mutazioni nel sistema di prova. Raccomandazioni relative ai metodi statistici più appropriati figurano nella letteratura scientifica (66) (67).

66. A condizione che siano soddisfatti tutti i criteri di accettabilità, la sostanza chimica in esame è considerata chiaramente negativa se, in tutte le condizioni sperimentali esaminate (cfr. il paragrafo 33):

— nessuna delle concentrazioni sperimentali presenta un incremento statisticamente significativo rispetto al concomitante controllo negativo;

— un test di tendenza appropriato dimostra che non vi è aumento correlato alla concentrazione;

▼M8

— tutti i risultati si situano entro la distribuzione dei dati di controllo negativi storici (ad es. limite del controllo al 95 % in base alla distribuzione di Poisson, cfr. il paragrafo 48).

La sostanza chimica in esame è quindi ritenuta non in grado di indurre mutazioni nel sistema di prova.

Per entrambe le prove MLA e TK6:

67. se la concentrazione massima è basata sulla citotossicità, la concentrazione più elevata dovrebbe mirare a realizzare un tasso di RTG/RS compreso fra 20 e 10 %. Opinione prevalente è che occorre prestare un'attenzione particolare nell'interpretare i risultati positivi ottenuti solo a un tasso di RTG/RS compreso fra il 20 e il 10 % e che un risultato non sarebbe considerato positivo se l'incremento della MF si verificasse solo a un tasso di RTG/RS del 10 % o inferiore (se valutato) (2)(59).

68. In talune circostanze le informazioni supplementari possono contribuire a determinare se una sostanza chimica in esame non sia mutagena nel caso in cui non vi siano colture che presentano un tasso di RTG/RS compreso fra il 10 e il 20 %. Tali situazioni sono delineate come segue. 1) Non vi sono prove di mutagenicità (ad es. nessuna risposta alla dose, nessuna frequenza dei mutanti superiore a quelle osservate nei controlli negativi concomitanti o negli intervalli storici di fondo, ecc.) in una serie di dati puntuali del tasso di RTG/RS compresi fra il 100 e il 20 % con almeno un dato puntuale del tasso di RTG/RS compreso fra il 20 e il 25 %. 2) Non vi sono prove di mutagenicità (ad es. nessuna risposta alla dose, nessuna frequenza dei mutanti superiore a quelle osservate nei controlli negativi concomitanti o negli intervalli storici di fondo, ecc.) in una serie di dati puntuali del tasso di RTG/RS situati fra il 100 e il 25 % e si registra anche un dato puntuale del tasso di RTG/RS negativo lievemente inferiore al 10 %. In entrambe le situazioni si può concludere che la sostanza in esame è negativa.

69. Non è necessario verificare una risposta palesemente positiva o negativa.

70. Se la risposta non è chiaramente negativa o positiva, come descritto in precedenza, e/o al fine di contribuire a stabilire la rilevanza biologica di un risultato, i dati devono venire sottoposti al giudizio di esperti e/o a indagini più approfondite. Può essere utile ripetere un esperimento modificandone eventualmente le condizioni (ad esempio, intervallazione delle concentrazioni per aumentare la probabilità di raggiungere i dati puntuali situati nell'intervallo del tasso di RTG/RS compreso fra il 10 e il 20 %, altre condizioni di attivazione metabolica (ossia concentrazione S9 o di origine S9) e durata del trattamento].

71. In rari casi, anche dopo ulteriori analisi, la serie di dati non consente di valutare i risultati come positivi o negativi. Pertanto la risposta della sostanza chimica in esame va considerata equivoca (interpretata come altrettanto positiva o negativa).

RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DELLA PROVA

72. La relazione sull'esecuzione della prova comprende le informazioni riportate di seguito.

Sostanza chimica in esame:

— origine, numero di lotto e data di scadenza, se disponibile;

— stabilità della sostanza chimica in esame, se nota;

— solubilità e stabilità della sostanza in esame nel solvente, se note;

▼M8

— misurazione del pH, dell'osmolalità e del precipitato nel terreno di coltura al quale è stata aggiunta la sostanza chimica in esame, se del caso.

Sostanza monocostituente:

— aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;

— identificazione chimica, come la denominazione IUPAC o CAS, il numero CAS, il codice SMILES o InChI, la formula strutturale, la purezza, l'identità chimica delle impurezze, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc.

Sostanza multicostituente, UVCB e miscele:

— caratterizzate nella massima misura possibile con l'identità chimica (vedasi sopra), con la presenza quantitativa e con le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti.

Solvente:

— giustificazione della scelta del solvente;

— percentuale di solvente nel terreno di coltura finale.

Cellule:

Per le colture madri di laboratorio:

— tipo e provenienza delle cellule nonché dati storici del laboratorio che esegue la prova;

— caratteristiche del cariotipo e/o numero modale di cromosomi;

— metodi usati per il mantenimento delle colture cellulari;

— assenza di micoplasma;

— tempi di raddoppiamento delle cellule.

Condizioni sperimentali:

— criteri di selezione delle concentrazioni e del numero di colture cellulari: ad esempio i dati relativi alla citotossicità e ai limiti di solubilità;

— composizione dei terreni di coltura, concentrazione di CO_2, livello di umidità;

— concentrazione della sostanza chimica in esame espressa come concentrazione finale nel terreno di coltura (ad esempio µg o mg/ml o mM di terreno di coltura);

— concentrazione (e/o volume) del solvente e della sostanza chimica in esame aggiunti nel terreno di coltura;

— temperatura di incubazione;

— tempo di incubazione;

— durata del trattamento;

— densità delle cellule durante il trattamento;

▼M8

— tipo e composizione del sistema di attivazione metabolica (fonte di S9, metodo di preparazione della miscela S9, concentrazione o volume della miscela S9 e di S9 nel terreno di coltura finale, controlli di qualità S9);

— sostanze di controllo positive e negative, concentrazioni finali per ciascuna condizione di trattamento;

— durata del periodo di espressione (con numero di cellule inseminate, sub-colture e protocolli di alimentazione, se del caso);

— identità e concentrazione dell'agente selettivo;

— per la prova MLA, si indica la versione utilizzata (gel di agarosio o microtitolazione)

— criteri di accettabilità delle prove;

— metodi usati per contare il numero di cellule vitali e mutanti;

— metodi utilizzati per la misurazione della citotossicità;

— eventuali informazioni supplementari pertinenti per la citotossicità e metodo utilizzato;

— durata dei tempi di incubazione dopo la piastratura;

— definizione delle colonie considerate, per dimensione e tipo (compresi i criteri in base a cui le colonie sono considerate "piccole" o "grandi", se del caso).

— criteri in base ai quali i risultati sono considerati positivi, negativi o ambigui;

— metodi utilizzati per determinare il pH, l'osmolalità e la precipitazione, se del caso.

Risultati:

— numero di cellule trattate e numero di cellule sottoposte a sub-coltura per ciascuna coltura;

— parametri di tossicità (tasso di RTG per MLA e di RS per TK6);

— segni di precipitazione e momento della determinazione;

— numero di cellule piastrate nel terreno di coltura selettivo e in quello non selettivo;

— numero di colonie nel terreno di coltura non selettivo e numero di colonie resistenti in quello selettivo e relative frequenze dei mutanti;

— dimensione delle colonie per i controlli negativi e positivi e, se la sostanza chimica in esame è positiva, almeno una concentrazione nonché le relative frequenze dei mutanti;

— relazione concentrazione-risposta, se possibile;

— dati sui controlli concomitanti negativi (solvente) e positivi (concentrazioni e solventi);

— dati sui controlli storici negativi (solvente) e positivi (concentrazioni e solventi), con intervalli, medie e deviazioni standard; numero di prove su cui si basano i controlli storici;

▼M8

— analisi statistiche (per le colture singole e le repliche raggruppate se del caso), e gli eventuali valori-p; e per la prova MLA, la valutazione GEF.

Discussione dei risultati

Conclusione

BIBLIOGRAFIA

(1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185-190.

(2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.

(3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127-140.

(4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1-5.

(5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.

(6) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21-28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.

▼**M8**

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci.., 109 (1): 96-105.

(10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): 51-55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169-181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161-174.

(14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143-153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77-87.

(16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89-98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

(18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89-95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.

(20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1-2): 177-183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

(22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879-886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297-305.

▼**M8**

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

(25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185-190.

(26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673-680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61-108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35-42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157-165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263-268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411–416.

(35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162-176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12-15.

▼**M8**

(37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).

(38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

(39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds), 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467-485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261-287.

(42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287-294.

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

(44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.

(45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83-90.

(46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277-290.

(47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. *Pathol*. *Toxicol*., 4 (1): 55-65

(48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175-177.

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

▼**M8**

(50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241-261.

(51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51-59.

(52) UNEP (2001). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP).

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

(54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795-801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.

(56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32-56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36-43.

(59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Consultabile al seguente indirizzo: [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373-384.

(61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363-378.

(62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9-17.

(63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1-8.

(64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87-90.

▼**M8**

(65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

(66) OECD (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼**M8**

Appendice 1

DEFINIZIONI

Aneugeno: detto di qualsiasi sostanza chimica o processo che, interagendo con le componenti del ciclo mitotico e meiotico di divisione cellulare, determina aneuploidia nelle cellule o negli organismi.

Aneuploidia: qualsiasi deviazione dal normale numero diploide (o aploide) di cromosomi da parte di uno o più cromosomi, ma non dell'intero corredo di cromosomi (poliploidia).

Mutageni che provocano la sostituzione di coppie di basi: sostanze che provocano la sostituzione di una o più coppie di basi del DNA.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Efficienza di clonazione: percentuale di cellule piastrate a bassa densità in grado di crescere in una colonia che può essere contata.

Clastogeno: qualsiasi sostanza chimica o processo in grado di provocare aberrazioni cromosomiche strutturali in popolazioni di cellule o organismi.

Citotossicità: per le prove di cui al presente metodo di prova, la citotossicità è identificata come riduzione della crescita relativa totale (RTG) o della sopravvivenza relativa (RS), rispettivamente per le prove MLA e TK6.

Mutazione "in avanti": una mutazione genica in cui dal tipo parentale alla forma mutante si ha alterazione o perdita dell'attività enzimatica o della funzione della proteina codificata.

Mutageni che provocano la mutazione della fase di lettura: sostanze chimiche che provocano l'inserzione o la delezione di una o più coppie di basi nella molecola di DNA.

Genotossico: termine generico che comprende tutti i tipi di danno a carico del DNA o dei cromosomi, tra cui rottura del DNA, cancellazioni, riarrangiamenti, mutazioni, aberrazioni cromosomiche e aneuploidia. Non tutti i tipi di effetti genotossici determinano alterazioni cromosomiche o danni permanenti ai cromosomi.

Ricombinazione mitotica: durante la mitosi, ricombinazione fra cromatidi omologhi risultanti nell'eventuale induzione di rotture del doppio filamento del DNA o in una perdita di eterozigosi.

Mutageno: un fattore in grado di provocare mutazioni ereditarie della o delle sequenze di coppie di basi del DNA nei geni o della struttura dei cromosomi (aberrazioni cromosomiche).

Frequenza dei mutanti (MF): numero di cellule mutanti diviso per il numero di cellule vitali.

Tempo di espressione fenotipica: il tempo trascorso dal trattamento durante il quale l'alterazione genetica si fissa nel genoma e tutti i prodotti genici preesistenti scompaiono fino all'alterazione del tratto fenotipico.

Tasso di sopravvivenza relativa (RS): il tasso di RS è utilizzato come misura della citotossicità del trattamento nella prova TK6. Si tratta dell'efficienza di clonazione (CE) delle cellule piastrate subito dopo il trattamento, adeguata per le eventuali perdite di cellule durante il trattamento, rispetto all'efficienza di clonazione nei controlli negativi.

▼M8

Crescita in sospensione relativa (RSG): per la prova MLA, la crescita totale relativa di due giorni in sospensione della coltura sperimentale rispetto alla crescita totale di due giorni in sospensione del controllo negativo/con solvente (Clive e Spector, 1975). Il tasso di RSG include la crescita relativa della coltura sperimentale rispetto al controllo negativo/con solvente durante il periodo di trattamento.

Crescita relativa totale (RTG): il tasso di RTG è utilizzato come misura della citotossicità del trattamento nella prova MLA. È una misura della crescita relativa (del controllo con mezzo disperdente) delle colture sperimentali durante le fasi di trattamento, di espressione di due giorni e di clonazione della selezione dei mutanti della prova. Il tasso di RSG di ciascuna coltura sperimentale è moltiplicato per l'efficienza di clonazione relativa della coltura sperimentale al momento della selezione dei mutanti ed espressa in relazione all'efficienza di clonazione del controllo negativo/con solvente (Clive and Spector, 1975).

Frazioni S9 di fegato: supernatante dell'omogenato di fegato centrifugato a 9 000 g (estratto di fegato crudo).

Miscela di frazione S9: miscela di frazione S9 di fegato e dei cofattori necessari all'attività degli enzimi metabolici.

Crescita in sospensione (SG): fattore di incremento del numero di cellule durante le fasi di trattamento ed espressione della prova MLA. Il valore di SG è calcolato moltiplicando l'aumento del giorno 1 per l'aumento del giorno 2 nel trattamento di breve durata (3-4 ore). Se si applica un trattamento di 24 ore, il valore di SG è pari all'aumento durante le 24 ore di trattamento moltiplicato per l'aumento dei giorni di espressione 1 e 2.

Controllo con solvente: termine generico che designa le colture di controllo che ricevono unicamente il solvente utilizzato per dissolvere la sostanza chimica in esame.

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

Controllo non trattato: i controlli non trattati sono colture non sottoposte a trattamento (che non ricevono alcuna sostanza chimica in esame né solvente) ma preparate in modo identico alle culture esposte alla sostanza chimica in esame.

▼M8

Appendice 2

FORMULE

Citotossicità

Per entrambe le versioni (gel di agarosio e microtitolazione) della prova MLA

La citotossicità è definita come la crescita relativa totale (RTG) che comprende la crescita in sospensione relativa (RSG) durante il periodo di espressione di 2 giorni e l'efficienza di clonazione relativa (RCE) ottenuta al momento della selezione dei mutanti. I tassi di RTG, RSG e RCE sono tutti espressi come percentuali.

Calcolo del tasso di RSG: la crescita in sospensione 1 (SG_1) corrisponde al tasso di crescita fra il giorno 0 e il giorno 1 (concentrazione delle cellule il giorno 1 / concentrazione delle cellule il giorno 0) e la crescita in sospensione 2 (SG_2) corrisponde al tasso di crescita fra il giorno 1 e il giorno 2 (concentrazione delle cellule il giorno 2 / concentrazione delle cellule il giorno 1). Il tasso di RSG corrisponde al valore totale di SG (SG_1 x SG_2) della coltura trattata rispetto al controllo non trattato/con solvente. Ossia: RSG = [$SG_{1(test)}$ x $SG_{2(test)}$] / [$SG_{1(control)}$ x $SG_{2(control)}$] Il valore di SG_1 va calcolato a partire dalla concentrazione delle cellule iniziale utilizzata all'inizio del trattamento delle stesse. Questo spiega un'eventuale citotossicità differenziale che si verifica nella o nelle colture sperimentali durante il trattamento delle cellule.

Il tasso di RCE corrisponde all'efficienza di clonazione relativa della coltura sperimentale rispetto all'efficienza di clonazione relativa del controllo non trattato/con solvente ottenuta al momento della selezione dei mutanti.

Crescita relativa totale (RTG): RTG=RSG x RCE

TK6

Tasso di sopravvivenza relativa (RS)

La citotossicità è valutata mediante il tasso di sopravvivenza relativa, ossia l'efficienza di clonazione (CE) delle cellule piastrate subito dopo il trattamento, adeguata per le eventuali perdite di cellule durante il trattamento, rispetto all'efficienza di clonazione nei controlli negativi (cui è assegnata una sopravvivenza del 100 %). L'adeguamento per la perdita di cellule durante il trattamento è calcolato come:

$$\text{CE adattata} = \text{CE} \times \frac{\textit{Numero di cellule alla fine del trattamento}}{\textit{Numero di cellule all'inizio del trattamento}}$$

Il tasso di RS per una coltura trattata con una sostanza chimica in esame è calcolato come:

$$RS = \frac{\textit{CE adattata nella coltura trattatae}}{\textit{CE adattata nel controllo con solvente}} \times 100$$

Frequenza dei mutanti per entrambe le prove MLA e TK6

La frequenza dei mutanti (MF) è l'efficienza di clonazione delle colonie mutanti nel terreno di coltura selettivo (CE_M) adattato per l'efficienza di clonazione nel terreno non selettivo al momento della selezione (CE_V). Ossia MF=CE_M/CE_V. Il calcolo di queste due efficienze di clonazione è descritto oltre per i metodi di clonazione con gel di agarosio e microtitolazione.

▼**M8**

MLA, versione gel di agarosio: nella versione della prova MLA con gel di agarosio, il numero di colonie sulla piastra di selezione dei mutanti (C_M) e il numero di colonie presenti su quella non selezionata o destinata a misurare l'efficienza di clonazione (conta della vitalità) (C_V) sono ottenuti mediante conteggio diretto dei cloni. Se si piastrano 600 cellule ai fini dell'efficienza di clonazione (CE), le piastre utilizzate per la selezione dei mutanti (CE_M) e le piastre non selezionate o destinate a misurare l'efficienza di clonazione (conta della vitalità) (CE_V) e che per la selezione dei mutanti si usano 3×10^6 cellule,

$CE_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$

$CE_V = C_V / 600$

MLA e TK6, versione a microtitolazione: nella versione a microtitolazione della prova MLA, i valori C_M e C_V sono determinati come il prodotto del numero totale di pozzetti (TW) e il numero probabile di colonie per pozzetto (P) sulle piastre di microtitolazione.

$C_M = P_M \times TW_M$

$C_V = P_V \times TW_V$

Dal termine zero della distribuzione di Poisson (Furth *et al.*, 1981), P è dato da

$P = - \ln (EW / TW)$

Dove EW è il numero di pozzetti vuoti e TW è il numero totale di pozzetti. Quindi,

$CE_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$

$CE_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$

Per la versione a microtitolazione della prova MLA, le frequenze dei mutanti delle colonie piccole e grandi si calcolano in modo identico, utilizzando il pertinente numero di pozzetti vuoti per le colonie piccole e grandi.

Per la prova TK6 le frequenze di mutanti delle colonie piccole e grandi sono basate sulla comparsa precoce e tardiva dei mutanti.

▼M8

B.68. **METODO DI PROVA DI EPOSIZIONE IN VITRO DI BREVE DURATA PER L'IDENTIFICAZIONE DI i) SOSTANZE CHIMICHE CHE INDUCONO GRAVI LESIONI OCULARI E ii) SOSTANZE CHIMICHE CHE NON RICHIEDONO CLASSIFICAZIONE PER IRRITAZIONE OCULARE O GRAVI LESIONI OCULARI**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼M8

B.69. **METODO DI PROVA SU MODELLO DI EPITELIO CORNEALE UMANO RICOSTITUITO (RhCE) PER L'IDENTIFICAZIONE DELLE SOSTANZE CHIMICHE CHE NON RICHIEDONO CLASSIFICAZIONE NÉ ETICHETTATURA PER IRRITAZIONE OCULARE O GRAVI LESIONI OCULARI**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼M8

B.70. **SAGGIO *IN VITRO* CHE UTILIZZA IL RECETTORE ESTROGENICO RICOMBINANTE UMANO (hrER) PER INDIVIDUARE LE SOSTANZE CHIMICHE CHE PRESENTANO UN'AFFINITÀ DI LEGAME CON I RECETTORI DI ESTROGENI**

▼M11

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼M8

B.71. **PROVE DI SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA *IN VITRO* RIGUARDANTI L'EVENTO CHIAVE NELL'ATTIVAZIONE DI CELLULE DENDRITICHE NEL MECCANISMO D'AZIONE DEGLI EFFETTI AVVERSI (AOP) PER LA SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 2 della parte 0.

▼B

PARTE C: METODI PER LA DETERMINAZIONE DELL'ECOTOSSICITÀ

INDICE

C.1. TOSSICITÀ ACUTA PER I PESCI

C.2. SAGGIO DI IMMOBILIZZAZIONE ACUTA IN *DAPHNIA SP*

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

C.4. BIODEGRADAZIONE Determinazione della «pronta» (ready) biodegradabilità

PARTE I. CONSIDERAZIONI GENERALI

PARTE II. SAGGIO DI RIMOZIONE LENTA DEL DOC (Metodo C.4-A)

PARTE III. SAGGIO DI SCREENING OCSE MODIFICATO (Metodo C.4-B)

PARTE IV. SAGGIO DI SVILUPPO DEL CO_2 (Metodo C.4-C)

PARTE V. SAGGIO RESPIROMETRICO MANOMETRICO (Metodo C.4-D)

Parte VI. SAGGIO DELLA BOTTIGLIA CHIUSA (Metodo C.4-E)

PARTE VII. SAGGIO M.I.T.I. (Metodo C.4-F)

C.5. DEGRADAZIONE — DOMANDA BIOCHIMICA DI OSSIGENO (BOD)

C.6. DEGRADAZIONE — DOMANDA CHIMICA DI OSSIGENO (COD)

C.7. DEGRADAZIONE — DEGRADAZIONE ABIOTICA: IDROLISI IN FUNZIONE DEL PH

C.8. TOSSICITÀ PER I LOMBRICHI

C.9. BIODEGRADAZIONE — ZAHN — WELLENS TEST

C.10. PROVA DI SIMULAZIONE SUI SISTEMI DI TRATTAMENTO AEROBICO DEI LIQUAMI: C.10-A: UNITÀ CON FANGHI ATTIVI — C.10-B: BIOFILM

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

C.12. BIODEGRADAZIONE — SAGGIO SCAS MODIFICATO

C.13. BIOACCUMULO NEI PESCI: ESPOSIZIONE ATTRAVERSO L'AMBIENTE ACQUATICO E PER VIA ALIMENTARE

C.14. TEST SULLA CRESCITA DEI PESCI GIOVANI

C.15. PESCI, PROVA DI TOSSICITÀ A BREVE TERMINE SUGLI STADI DI EMBRIONI E DI LARVA CON SACCO VITELLINO

C.16. API MELLIFERE — TEST DI TOSSICITÀ ORALE ACUTA

C.17. API MELLIFERE — TEST DI TOSSICITÀ ACUTA PER CONTATTO

C.18. ADSORBIMENTO/DESORBIMENTO: METODO DISCONTINUO ALL'EQUILIBRIO

▼B

C.19. STIMA DEL COEFFICIENTE DI ADSORBIMENTO *(K_{OC})* SUL TERRENO E SUI FANGHI DI ACQUE DA SCARICO MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)

C.20. PROVA DI RIPRODUZIONE CON *DAPHNIA MAGNA*

C.21. MICRORGANISMI DEL SUOLO: TEST DI TRASFORMAZIONE DELL'AZOTO

C.22. MICRORGANISMI DEL SUOLO: TEST DI TRASFORMAZIONE DEL CARBONIO

C.23. TRASFORMAZIONE AEROBICA E ANAEROBICA NEL SUOLO

C.24. TRASFORMAZIONE AEROBICA E ANAEROBICA NEI SISTEMI SEDIMENTOSI ACQUATICI

C.25. MINERALIZZAZIONE AEROBICA DELLE ACQUE DI SUPERFICIE — SAGGIO DI SIMULAZIONE DELLA BIODEGRADAZIONE

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

C.27. PROVA DI TOSSICITÀ SU CHIRONOMIDE IN ACQUA-SEDIMENTO CON SEDIMENTO ADDIZIONATO

C.28. PROVA DI TOSSICITÀ SU CHIRONOMIDI IN SEDIMENTO-ACQUA CON ACQUA ADDIZIONATA

C.29. PRONTA BIODEGRADABILITÀ — CO_2 IN RECIPIENTI ERMETICI (prova del CO_2 nello spazio di testa)

C.30. BIOACCUMULO NEGLI OLIGOCHETI TERRESTRI

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

C.32. PROVA DI RIPRODUZIONE SU ENCHITREIDI

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

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

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

C.36. PROVA DI INIBIZIONE DEL TASSO RIPRODUTTIVO DI UN ACARO PREDATORE (*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*) IN CAMPIONI DI SUOLO

C.37. SAGGIO DI 21 GIORNI SUI PESCI: SCREENING A BREVE TERMINE DELL' ATTIVITÀ ANDROGENICA, ESTROGENICA E DELL'INIBIZIONE DELL'AROMATASI

C.38. PROVA SULLA METAMORFOSI DEGLI ANFIBI

C.39. PROVA DI RIPRODUZIONE DI COLLEMBOLI IN CAMPIONI DI SUOLO

▼B

C.40. PROVA DI TOSSICITÀ SUL CICLO DI VITA DEI CHIRONOMIDI IN ACQUA-SEDIMENTO CON ACQUA ADDIZIONATA O SEDIMENTO ADDIZIONATO

C.41. PROVA SULLO SVILUPPO SESSUALE DEI PESCI

C.42. BIODEGRADABILITÀ NELL'ACQUA DI MARE

C.43. BIODEGRADABILITÀ ANAEROBICA DELLE SOSTANZE ORGANICHE NEI FANGHI DIGERITI: MISURAZIONE DELLA PRODUZIONE DI GAS

C.44. LISCIVIAZIONE SU COLONNE DI SUOLO

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

C.46. BIOACCUMULO NEGLI OLIGOCHETI BENTONICI CHE VIVONO NEI SEDIMENTI

C.47. PROVA DI TOSSICITÀ SUI PESCI NEI PRIMI STADI DI VITA

C.48. SAGGIO DI TOSSICITÀ A BREVE TERMINE SULLA RIPRODUZIONE DI PESCI

C.49. PROVA DI TOSSICITÀ ACUTA SUGLI EMBRIONI DI PESCI

C.50. PROVA DI TOSSICITÀ SU *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* IN UN SISTEMA DI PROVA SENZA SEDIMENTO

C.51. PROVA DI TOSSICITÀ SU *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* IN UN SISTEMA DI PROVA ACQUA-SEDIMENTO

C.52. PROVA ESTESA DI RIPRODUZIONE SU UNA GENERAZIONE DI MEDAKA (MEOGRT)

C.53. METODO DI PROVA SULLA CRESCITA E LO SVILUPPO DELLE LARVE DI ANFIBIO (LAGDA)

▼B

C.1. **TOSSICITÀ ACUTA PER I PESCI**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 3 della parte 0.

▼B

C.2. SAGGIO DI IMMOBILIZZAZIONE ACUTA IN *DAPHNIA SP.*

1. METODO

Il presente metodo di prova di immobilizzazione acuta corrisponde a quello descritto nelle linee guida dell'OCSE TG 202 (2004).

1.1. INTRODUZIONE

Il presente metodo descrive un saggio di tossicità acuta finalizzato a determinare gli effetti di una sostanza chimica sulle dafnie. Per quanto possibile sono stati utilizzati i metodi di prova esistenti (1)(2)(3).

1.2. DEFINIZIONI

Ai fini del presente metodo si applicano le seguenti definizioni:

EC_{50}: concentrazione stimata che immobilizza il 50 % delle dafnie entro un periodo di esposizione prestabilito. Se si applica una definizione diversa, è necessario indicarlo con i relativi riferimenti bibliografici.

Immobilizzazione: sono considerati immobili gli animali che, dopo lieve agitazione del contenitore usato per il saggio, non sono in grado di nuotare entro 15 secondi (anche se possono ancora muovere le antenne).

1.3. PRINCIPIO DEL METODO

Le giovani dafnie, di età inferiore a 24 ore all'inizio del saggio, sono esposte alla sostanza di prova ad un certo range di concentrazione per 48 ore. L'immobilizzazione viene registrata dopo 24 ore e dopo 48 ore e comparata ai valori di controllo. I risultati sono successivamente analizzati per calcolare la EC_{50} a 48 ore (cfr. definizioni al punto 1.2.). La determinazione della EC_{50} a 24 ore è facoltativa.

1.4. INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA DI PROVA

È necessario conoscere la solubilità in acqua e la pressione di vapore della sostanza di prova e deve essere disponibile un metodo analitico affidabile per quantificare la sostanza nelle soluzioni di prova con una efficienza di recupero e un limite di rilevamento noti. Tra le informazioni utili di cui disporre figurano la formula di struttura, la purezza della sostanza, la stabilità in acqua o alla luce, P_{ow} e i risultati di un saggio di biodegradabilità con metodo *ready* (cfr. metodo C.4).

Nota: orientamenti per testare sostanze con caratteristiche fisico-chimiche che rendono difficoltosa l'esecuzione del saggio sono contenuti in (4).

1.5. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Una sostanza di riferimento può essere sottoposta a prova per determinarne l'EC50 al fine di garantire che le condizioni di prova sono affidabili. A tal fine si raccomanda l'utilizzo di tossicanti utilizzati in prove interlaboratorio *(ring test)* (1)(5) ([1]). La o le prove con una sostanza di riferimento devono essere condotte preferibilmente una volta al mese e almeno due volte l'anno.

([1]) I risultati di queste prove interlaboratorio e una rettifica tecnica alla norma tecnica ISO 6341 danno una EC50 — 24 h del dicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) nell'intervallo 0,6 mg/l-1,7mg/l.

▼B

1.6. CRITERI DI QUALITÀ

Ai fini della validità del saggio devono applicarsi i seguenti criteri:

— nei controlli, compreso il controllo contenente l'agente di solubilizzazione, l'immobilizzazione nelle dafnie non deve superare il 10 %,

— la concentrazione dell'ossigeno disciolto nei contenitori usati nel saggio e nei controlli deve essere ≥ 3 mg/l alla fine del saggio.

Nota: per il primo criterio, non più del 10 % delle dafnie di controllo deve presentare immobilizzazione o altri segni di disturbo o stress quali scolorazione o comportamento anomalo come il fatto di rimanere bloccate alla superficie dell'acqua.

1.7. DESCRIZIONE DEL METODO

1.7.1. **Apparecchiature**

I contenitori e gli altri apparecchi destinati ad entrare in contatto con le soluzioni di prova devono essere interamente di vetro o di altro materiale chimicamente inerte. I contenitori saranno in genere provette o bicchieri di vetro; prima di ogni uso devono essere puliti secondo le normali procedure di laboratorio. I contenitori utilizzati nelle prove devono essere coperti in maniera non ermetica per ridurre la perdita d'acqua per evaporazione ed evitare che penetri polvere nelle soluzioni. Le sostanze volatili devono essere testate in contenitori chiusi e completamente riempiti, abbastanza grandi da evitare che l'ossigeno raggiunga un livello troppo scarso o tale da avere un effetto limitante (cfr. punto 1.6 e punto 1.8.3, primo paragrafo).

Oltre ai contenitori saranno utilizzate alcune o tutte le apparecchiature indicate di seguito: misuratore di ossigeno (con microelettrodo o altro apparecchio adatto per la misurazione dell'ossigeno disciolto in campioni di piccolo volume); pH-metro; apparecchiatura adeguata per il controllo della temperatura; apparecchiatura per determinare la concentrazione di carbonio organico totale (TOC); apparecchiatura per determinare la domanda chimica di ossigeno (COD); apparecchiatura per la determinazione della durezza dell'acqua, ecc.

1.7.2. **Organismo sottoposto al saggio**

Daphnia magna Straus è la specie sperimentale preferita, anche se è possibile ricorrere ad altre specie (ad esempio *Daphnia pulex).* All'inizio del saggio gli animali devono avere meno di 24 ore di vita; per ridurre la variabilità è fortemente consigliabile non utilizzare progenie provenienti dalla prima nidiata. Devono provenire da una popolazione sana (senza segni di stress quali un alto tasso di mortalità, presenza di maschi e formazione di efippi, ritardo nella produzione della prima nidiata, scolorazione ecc.). Tutti gli organismi utilizzati per una prova particolare devono provenire da colture derivanti dalla stessa popolazione di dafnie. Gli animali della popolazione vanno mantenuti in condizioni colturali (luce, temperatura, mezzo) simili a quelle che verranno utilizzate nel saggio. Se il mezzo di coltura delle dafnie da usare nel saggio è diverso da quello utilizzato di routine per la coltura delle dafnie, è buona prassi prevedere un periodo di acclimatazione prima del saggio. A tal fine le dafnie parentali devono essere mantenute in acqua di diluizione alla temperatura di prova per almeno 48 ore prima dell'inizio del saggio.

▼B

1.7.3. **Acqua di allevamento e di diluizione**

È possibile utilizzare come acqua di allevamento e acqua di diluizione acqua naturale (di superficie o freatica), acqua ricostituita o acqua di rubinetto non clorata se le dafnie sopravvivono per la durata della coltura, dell'acclimatazione e della prova senza manifestare segni di stress. Le acque che presentano le caratteristiche chimiche indicate all'allegato I riferite ad un'acqua di diluizione accettabile sono considerate adatte come acque da utilizzare per il saggio. Per tutta la durata del saggio l'acqua deve mantenere una qualità costante. L'acqua ricostituita può essere ottenuta aggiungendo ad acqua deionizzata o distillata specifiche quantità di reagenti di grado analitico riconosciuto. Esempi di acqua ricostituita sono indicati in (1)(6) e all'allegato II. Per saggiare sostanze contenenti metalli non utilizzare mezzi contenenti agenti chelanti noti, come l'M4 e l'M7 indicati all'allegato II. Il pH deve essere compreso tra 6 e 9. Per la *Daphnia magna* si raccomanda una durezza compresa tra 140 e 250 mg/l (come $CaCO_3$), mentre per altre specie di *Daphnia* può essere più opportuna una durezza inferiore. L'acqua di diluizione deve essere aerata prima di utilizzarla nel saggio per consentire alla concentrazione di ossigeno disciolto di raggiungere la saturazione.

Se si utilizza acqua naturale, i parametri relativi alla qualità devono essere misurati almeno due volte all'anno oppure ogni volta si sospetti che tali caratteristiche possano essersi modificate sensibilmente (cfr. paragrafo precedente e allegato I). È inoltre necessario misurare i metalli pesanti (ad esempio Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Se si utilizza acqua di rubinetto non clorata, è preferibile procedere ad un'analisi giornaliera del cloro. Se l'acqua di diluizione proviene da una sorgente di acqua di superficie o da una sorgente freatica, è necessario misurare la conduttività e il carbonio organico totale (TOC) oppure la domanda chimica di ossigeno (COD).

1.7.4. **Soluzioni di prova**

Le soluzioni di prova delle concentrazioni scelte sono in genere preparate diluendo una soluzione madre. Le soluzioni madre devono essere preferibilmente preparate mediante dissoluzione della sostanza di prova nell'acqua di diluizione. Per quanto possibile evitare l'impiego di solventi, emulsionanti o agenti di dispersione; in alcuni casi, tuttavia, può essere necessario usare questi composti per ottenere una soluzione madre della concentrazione corretta. Per ottenere indicazioni sull'impiego dei solventi, emulsionanti e agenti di dispersione adeguati, consultare il testo (4). In ogni caso, la sostanza di prova contenuta nelle soluzioni di prova non deve superare il limite di solubilità nell'acqua di diluizione.

Il saggio deve essere effettuato senza regolazione del pH. Se quest'ultimo non rimane nell'intervallo 6-9 si consiglia di ripetere il saggio regolando il pH della soluzione madre in base a quello dell'acqua di diluizione prima di aggiungere la sostanza di prova. La regolazione del pH deve essere effettuata in modo tale che la concentrazione della soluzione madre non vari in modo significativo e che non si producano reazioni chimiche o precipitazione della sostanza di prova. A tal fine sono da preferirsi l'HCl e l'NaOH.

▼B

1.8. PROCEDURA

1.8.1. **Condizioni di esposizione**

1.8.1.1. *Gruppi di prova e controlli*

Riempire i contenitori usati nel saggio con la quantità corretta di acqua di diluizione e soluzioni della sostanza di prova. Il rapporto tra volume di aria/volume di acqua all'interno del contenitore deve essere uguale per il gruppo di prova e il gruppo di controllo. Le dafnie sono successivamente collocate nei contenitori di prova. Per ciascuna concentrazione di prova e per i controlli devono essere utilizzati almeno 20 animali, preferibilmente suddivisi in quattro gruppi di cinque. Per ciascun animale sono necessari almeno 2 ml di soluzione di prova (cioè un volume di 10 ml per cinque dafnie per contenitore di prova). Il saggio può essere effettuato con un sistema di rinnovo semi-statico o con un sistema dinamico quando la concentrazione della sostanza di prova non è stabile.

Oltre alla serie di trattamento è necessario procedere a una serie di controlli con acqua di diluizione e, se opportuno, a una serie di controlli con agente solubilizzante.

1.8.1.2. *Concentrazioni di prova*

Si può procedere a una prova per determinare il range di concentrazione per il saggio definitivo, a meno di non disporre già di informazioni sulla tossicità della sostanza di prova. A tal fine le dafnie sono esposte a una serie di concentrazioni della sostanza di prova molto intervallate tra loro. Cinque dafnie devono essere sottoposte a ciascuna concentrazione di prova per 48 ore al massimo e non sono necessarie ripetizioni. Il periodo di esposizione può essere ridotto (ad esempio a 24 ore o meno) se è possibile ottenere i dati necessari per determinare il range di concentrazione in meno tempo.

Devono essere utilizzate almeno cinque concentrazioni di prova in una serie geometrica con un rapporto geometrico preferibilmente non superiore a 2,2. Se vengono utilizzate meno di cinque concentrazioni è necessario motivare la scelta. La concentrazione più elevata testata deve preferibilmente produrre l'immobilizzazione totale (100 %), mentre la concentrazione più bassa non deve, di preferenza, causare alcun effetto osservabile.

1.8.1.3. *Condizioni di incubazione*

La temperatura deve essere compresa tra 18 °C e 22 °C e per ogni singolo saggio deve mantenersi costante con uno scarto di ± 1 °C. È consigliabile effettuare un ciclo di 16 ore di luce e un ciclo di 8 ore di buio. Si può anche procedere all'incubazione nell'oscurità totale, in particolare se le sostanze di prova sono instabili alla luce.

Durante il saggio i contenitori non devono essere aerati. Il saggio non richiede la regolazione del pH. Durante il saggio le dafnie non devono essere alimentate.

1.8.1.4. *Durata*

Il saggio dura 48 ore.

1.8.2. **Osservazioni**

Ciascun contenitore utilizzato per il saggio deve essere controllato per verificare l'immobilizzazione delle dafnie dopo 24 e dopo 48 ore dall'inizio del saggio (cfr. definizioni al punto 1.2). Oltre all'immobilità è necessario riferire su qualsiasi comportamento o aspetto anomali.

▼B

1.8.3. **Misurazioni analitiche**

L'ossigeno disciolto e il pH sono misurati all'inizio e alla fine del saggio nel/nei controllo/i e alla concentrazione più elevata della sostanza di prova. La concentrazione dell'ossigeno disciolto nei controlli deve rispettare il criterio di validità (cfr. punto 1.6). Il pH non deve in genere variare di oltre 1,5 unità in ciascun saggio effettuato. La temperatura viene in genere rilevata nei contenitori di controllo o nell'aria ambiente e dev'essere preferibilmente registrata in maniera continua durante il saggio o comunque almeno all'inizio e alla fine del saggio.

La concentrazione della sostanza di prova deve essere misurata almeno alla concentrazione di prova massima e minima, all'inizio e alla fine del saggio (4). I risultati devono basarsi sulle concentrazioni misurate. Tuttavia, se vi sono dati in grado di dimostrare che per tutta la durata del saggio la concentrazione della sostanza di prova si è mantenuta in maniera soddisfacente entro ± 20 % della concentrazione nominale o della concentrazione iniziale rilevata, i risultati possono anche basarsi sui valori nominali o sui valori iniziali misurati.

1.9. SAGGIO LIMITE

Usando le procedure descritte in questo metodo di prova, si può eseguire un saggio limite a 100 mg/l della sostanza di prova oppure fino al limite di solubilità di quest'ultima nel terreno utilizzato per il saggio (se è inferiore) allo scopo di dimostrare che la EC_{50} si colloca al di sopra di questa concentrazione. Il saggio limite deve essere eseguito usando 20 dafnie (preferibilmente suddivise in 4 gruppi di cinque), con un ugual numero nel gruppo (nei gruppi) di controllo. Se si verifica immobilizzazione, si deve eseguire uno studio completo. Ogni comportamento anomalo rilevato deve essere registrato.

2. **DATI**

I dati devono essere riassunti sotto forma di tabelle; per ogni gruppo di trattamento e gruppo di controllo devono essere indicati il numero di dafnie utilizzate e il grado di immobilizzazione rilevato ad ogni osservazione. Le percentuali di dafnie immobilizzate dopo 24 ore e dopo 48 ore devono essere rappresentate graficamente rispetto alle concentrazioni di prova. I dati devono essere analizzati con gli opportuni metodi statistici (come analisi *probit* ecc.) per calcolare l'andamento delle curve e la EC_{50} con limiti di affidabilità del 95 % ($p = 0,05$) (7) (8).

Se non è possibile applicare ai dati ottenuti i metodi standard di calcolo della EC_{50}, come valore approssimativo per la EC_{50} devono essere utilizzate la concentrazione massima che non causa immobilizzazione e la concentrazione minima che causa l'immobilità totale (100 %) (il valore è dato dalla media geometrica di queste due concentrazioni).

3. **RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL SAGGIO**

3.1. RAPPORTO DI PROVA

Il rapporto di prova deve includere le seguenti informazioni:

Sostanza di prova:

— natura fisica e caratteristiche fisico-chimiche,

▼B

— dati che ne consentano l'identificazione chimica, compresa la purezza.

Specie sottoposte al saggio:

— origine e specie di *Daphnia,* fornitore (se noto) e condizioni di coltura utilizzate (inclusa la fonte, il tipo e la quantità di alimento e la frequenza di alimentazione).

Condizioni di prova:

— descrizione dei contenitori utilizzati per il saggio: tipo di contenitori, volume della soluzione, numero di dafnie per contenitore, numero di contenitori di prova (ripetizioni) per concentrazione,

— metodi di preparazione della soluzione madre e della soluzione di prova, compreso l'eventuale impiego di solventi o agenti di dispersione, concentrazioni utilizzate,

— informazioni sull'acqua di diluizione: provenienza e caratteristiche di qualità dell'acqua (pH, durezza, rapporto Ca/Mg, rapporto Na/K, alcalinità, conduttività ecc.); composizione dell'acqua ricostituita, se utilizzata,

— condizioni di incubazione: temperatura, intensità luminosa e periodicità dell'esposizione alla luce, ossigeno disciolto, pH, ecc.

Risultati:

— numero e percentuale di dafnie immobilizzate o che hanno mostrato effetti negativi (compreso un comportamento anomalo) nei gruppi di controllo e in ciascun gruppo di trattamento, per ogni tempo di osservazione e descrizione del tipo di effetti osservati,

— risultati e data del saggio eseguito con la sostanza di riferimento, se disponibili,

— concentrazioni nominali di prova e risultato di tutte le analisi effettuate per determinare la concentrazione della sostanza di prova nei contenitori utilizzati nel saggio; devono essere indicati anche l'efficienza di recupero del metodo e il limite di determinazione,

— tutte le misurazioni fisico-chimiche di temperatura, pH e ossigeno disciolto svolte durante il saggio,

— EC_{50} a 48 ore per l'immobilizzazione con intervalli di affidabilità e grafici del modello adattato utilizzato per il calcolo, andamento delle curve dose-risposta ed errore standard; procedimenti statistici utilizzati per determinare la EC_{50} (questi stessi dati devono essere riportati anche per l'immobilizzazione a 24 ore, se misurati),

— spiegazione delle eventuali deviazioni rispetto al metodo di prova, con indicazione dell'eventuale incidenza della deviazione sui risultati ottenuti nel saggio.

4. **BIBLIOGRAFIA**

1. ISO 6341. (1996), Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test, terza edizione, 1996.

2. EPA OPPTS 850.1010 (1996), Ecological Effects Test Guidelines — Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

3. Environment Canada (1996), Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11, Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.
4. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment, No. 23, Parigi 2000.
5. Commissione delle Comunità europee, Studio D8369 (1979), Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*
6. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adottato nel settembre 1998.
7. Stephan C.E. (1977), *Methods for calculating an* LC_{50}, in Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (a cura di F.I. Mayer e J.L. Hamelink), ASTM STP 634 — American Society for Testing and Materials, pagg. 65-84.
8. Finney D.J. (1978), Statistical Methods in Biological Assay, terza edizione, Londra, Griffin, Weycombe, UK.

▼B

ALLEGATO 1

ALCUNE CARATTERISTICHE CHIMICHE RIFERITE AD UN'ACQUA DI DILUIZIONE DI QUALITÀ ACCETTABILE

Sostanza	Concentrazione
Particolato	< 20 mg/l
Carbonio organico totale	< 2 mg/l
Ammoniaca non ionizzata	< 1 µg/l
Cloro residuo	< 10 µg/l
Pesticidi organofosforici totali	< 50 ng/l
Pesticidi organoclorati totali più difenili policlorurati	< 50 ng/l
Cloro organico totale	< 25 ng/l

▼B

ALLEGATO 2

ESEMPI DI ACQUA RICOSTITUITA RITENUTA ADEGUATA PER IL SAGGIO

Acqua per il saggio ISO (1)

Soluzione madre (singola sostanza)		Per preparare l'acqua ricostituita, aggiungere i seguenti volumi di soluzione madre in 1 litro d'acqua (*)
Sostanza	Quantità aggiunta in 1 litro d'acqua (*)	
Cloruro di calcio $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Solfato di magnesio $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Bicarbonato di sodio $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Cloruro di potassio KCl	0,23 g	25 ml

(*) Acqua di purezza adeguata, ad esempio acqua non ionizzata, acqua distillata o sottoposta a trattamento di osmosi inversa con una conduttività preferibilmente inferiore o uguale a 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Mezzo Elendt M7 ed M4

Acclimatazione al mezzo Elendt M4 ed M7

Alcuni laboratori hanno riscontrato difficoltà a trasferire direttamente la *Daphnia* ai mezzi di coltura M4 ed M7. Qualche risultato è stato invece ottenuto con un'acclimatazione graduale, cioè trasferendo la *Daphnia* dal proprio mezzo ad un mezzo Elendt al 30 %, poi al 60 % e infine ad un mezzo Elendt al 100 %. I periodi di acclimatazione possono avere anche una durata di un mese.

Preparazione

Elementi in tracce

Preparare innanzitutto distinte soluzioni madre (I) dei singoli elementi in tracce in acqua di purezza adeguata, ad esempio acqua non ionizzata, acqua distillata o sottoposta a trattamento di osmosi inversa. Da queste soluzioni (I) preparare una seconda soluzione madre unica (II) contenente tutti gli elementi in tracce (soluzione combinata), cioè:

Soluzione(i) madre I (unica sostanza)	Quantità aggiunta all'acqua (mg/l)	Concentrazione (riferita al mezzo M4)	Per preparare la soluzione madre combinata II aggiungere i seguenti quantitativi di soluzione I all'acqua (ml/l)	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000 volte	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7 210	20 000 volte	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 volte	1,0	0,25

▼B

Soluzione(i) madre I (unica sostanza)	Quantità aggiunta all'acqua (mg/l)	Concentrazione (riferita al mezzo M4)	Per preparare la soluzione madre combinata II aggiungere i seguenti quantitativi di soluzione I all'acqua (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000 volte	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3 040	20 000 volte	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 volte	1,0	0,25
$Na_2\ MoO_4.2H_2O$	1 230	20 000 volte	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20 000 volte	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000 volte	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_2O$	200	20 000 volte	1,0	1,0
KI	65	20 000 volte	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000 volte	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000 volte	1,0	1,0
$Na_2EDTA.2H_2O$	5 000	2 000 volte	—	—
$FeSO_4.7H_2O$	1 991	2 000 volte	—	—

Le soluzioni Na 2 EDTA ed $FeSO_4$ sono preparate individualmente, mescolate e messe immediatamente in autoclave.

Il risultato è:

2 l Fe-EDTA solutione		1 000 volte	20,0	5,0

Mezzi di coltura M4 edM7

I mezzi di coltura M4 ed M7 sono preparati con la soluzione madre II, macronutrienti e vitamine come indicato nella tabella:

	Quantità aggiunta all'acqua (mg/l)	Concentrazione (riferita al mezzo M4)	Quantitativo di soluzione II aggiunto per preparare il mezzo di coltura (ml/l)	
			M4	M7
Soluzione madre II (elementi in tracce combinati)		20 volte	50	50
Soluzioni madre con macronutrienti (unica sostanza)				
$CaCl_2$ — $2H_2O$	293 800	1 000 volte	1,0	1,0
$MgSO_4$ — $7H_2O$	246 600	2 000 volte	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 volte	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000 volte	1,0	1,0
$Na_2\ SiO_3$ — $9H_2O$	50 000	5 000 volte	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000 volte	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000 volte	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000 volte	0,1	0,1

▼B

	Quantità aggiunta all'acqua (mg/l)	Concentrazione (riferita al mezzo M4)	Quantitativo di soluzione II aggiunto per preparare il mezzo di coltura (ml/l)	
			M4	M7
Soluzione madre di vitamine combinate	—	10 000 volte	0,1	0,1
La soluzione madre di vitamine combinate viene preparata aggiungendo le 3 vitamine indicate di seguitoin un litro d'acqua:				
Tiamina cloridrato	750	10 000 volte		
Cianocobalamina (B_{12})	10	10 000 volte		
Biotina	7,5	10 000 volte		

La soluzione di vitamine combinate è conservata in congelatore in piccole aliquote. Le vitamine vengono aggiunte al mezzo di coltura poco prima dell'utilizzo.

N.B.: Per evitare la precipitazione di sali durante la preparazione del mezzo di coltura completo, aggiungere le aliquote di soluzioni madre a circa 500-800 ml di acqua non ionizzata e poi riempire fino a raggiungere il litro.

N.B.: La prima pubblicazione riguardante il mezzo M4 si trova in Elendt, B. P. (1990), Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in *Daphnia magna Straus.* Protoplasma, 154, pagg. 25-33.

▼M6

C.3. ALGHE DI ACQUA DOLCE E CIANOBATTERI, 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_rC_x (per esempio E_rC_{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_yC_x (per esempio E_yC_{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).

▼M6

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

▼M6

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 CO_2 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.

▼M6

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	$2\text{-}5 \times 10^3$ 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

▼M6

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 CO_2. 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 del mezzo 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 CO_2 dall'aria circostante alla soluzione di prova, per esempio aumentando l'intensità dell'agitazione. Un'altra possibilità consiste nel ridurre la domanda di CO_2 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 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 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 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ (per quanto riguarda gli strumenti di misurazione calibrati in lux, l'intensità luminosa raccomandata di 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 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 ±15 % dall'intensità luminosa media.

▼M6

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 EC_{50} 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 disciolta, 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 ± 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 ± 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).

▼M6

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 consenta 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

▼M6

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'EC_x basati sul tasso di crescita specifico medio (E_rC_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 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_yC_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]:

▼M6

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

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]:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \qquad [2]$$

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:

▼M6

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

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 quantali (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

▼M6

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.

▼**M6**

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,

▼M6

— stima della tossicità per le variabili di risposta, per esempio EC_{50}, EC_{10} e EC_{20} 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 phytoplancton 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.

▼**M6**

(12) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc*. 50: 1096-1121

(13) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

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

(15) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 519-531.

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

(18) Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼M6

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 saggiata 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 saggiata seguendo il presente metodo di prova.

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

▼M6

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.

▼M6

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, Amblerside
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

▼M6

Aspetto e caratteristiche delle specie raccomandate

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
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)	$2\text{-}3 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$3\text{-}4 \times 10^{-8}$	$1\text{-}2 \times 10^{-8}$	$2\text{-}3 \times 10^{-9}$
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 $m^{-2} \cdot s^{-1}$ 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 contino 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.

▼M6

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 colturali. 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.

▼**M6**

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_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2$ $6H_2O$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2$ $2(H_2O)$	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 $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$, per raggiungere una concentrazione di 1,4 mg di Si/l.

▼**M6**

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:

$pH_{eq} = 11{,}30 + \log [HCO_3]$

Con 15 mg/l $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 7,5 (mezzo USA-EPA) e con 50 mg $NaHCO_3$/l, pH_{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
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Soluzione madre 2: ferro	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 mg/l
Soluzione madre 3: oligoelementi	
H_3BO_3	185 mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l

▼**M6**

Nutriente	Concentrazione nella soluzione madre
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 mg/l
Soluzione madre 4: bicarbonato $NaHCO_3$ $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	50 g/l

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 CO_2 atmosferico, se necessario facendo gorgogliare aria sterile e filtrata per alcune ore.

Preparazione del mezzo AAP

1. 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.

2. 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	$MgCl_2$ $6H_2O$	6,082 g
2.3	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,205 g
2.4	Soluzione madre micronutriente (cfr. punto 3).	
2.5	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,350 g
2.6	K_2HPO_4	0,522 g
2.7	$NaHCO_3$	7,500 g
2.8	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	Cfr. nota 1.

▼**M6**

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_3BO_3	92,760 mg	
3.2	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	207,690 mg	
3.3	$ZnCl_2$	1,635 mg	
3.4	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	79,880 mg	
3.5	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,714 mg	
3.6	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	3,630 mg	
3.7	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,006 mg	
3.8	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	150,000 mg	[disodio (etilendiamina-)tetracetato]
3.9	$Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$	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.

▼M6

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 unialgali.

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 strisciate 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.

▼M6

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 $C \rightarrow$ 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

▼M6

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 EC_{50} 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 EC_{20} è spesso migliore di quelli EC_{10}, perché la EC_{20} si situa generalmente sulla parte quasi lineare della curva centrale concentrazione-risposta. A volte, la EC_{10} può essere difficile da interpretare a causa della stimolazione di crescita, di modo che, sebbene la EC_{10} si ottenga generalmente con una precisione sufficiente, si raccomanda di riportare sempre anche la EC_{20}.

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:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

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 $n/\Sigma\ w_i$ (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)

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

▼**M6**

con una varianza $Var(Y_i) = Var\ (r_i/r_0) \cong (\partial Yi / \partial\ r_i) \cdot Var(r_i) + ((\partial\ Y_i / \partial\ r_0)^2 \cdot Var(r_0)$

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 m_0 replicates: $Var(r_i) = \sigma^2/m_i$

la varianza totale della risposta relativa, Y_i diventa quindi:

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

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 EC_{10} e la EC_{50}, come parametri da stimare [data la funzione I = f (α, β, concentrazione), si utilizzino le relazioni di definizione f (α, β, EC_{10}) = 0,1 e f (α, β, EC_{50}) = 0,5 per sostituire f (α, β, concentrazione) con una funzione equivalente g (EC_{10}, EC_{50}, 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 r_0.

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 Agricoltural, Biological and Environmental Statistics, 3, 405-420.

▼B

C.4. BIODEGRADAZIONE DETERMINAZIONE DELLA «PRONTA» (READY) BIODEGRADABILITÀ

PARTE I. CONSIDERAZIONI GENERALI

1.1. INTRODUZIONE

Vengono descritti sei metodi d'analisi che permettono di valutare la pronta biodegradabilità di composti chimici in un mezzo acquoso in condizioni aerobiche:

a) Carbonio organico disciolto (DOC) — rimozione lenta (Metodo C.4-A)

b) «Screening» OCSE modificato — rimozione lenta del DOC (Metodo C.4-B)

c) Sviluppo di biossido di carbonio (CO_2) — Saggio di Sturm modificato) (Metodo C.4-C)

d) Respirometria manometrica (Metodo C.4-E)

e) Bottiglia chiusa (Metodo C.4-E)

f) MITI (Ministero del Commercio Internazionale e dell'Industria — Giappone) (Metodo C.4-F)

Nella Parte I del metodo sono date indicazioni di carattere generale nonchè considerazioni comuni per tutti sei i saggi. Gli aspetti specifici dei metodi sono presentati nelle parti da II a VII. Gli allegati contengono definizioni, formule e materiale operativo.

Un saggio di confronto interlaboratori OCSE, effettuato nel 1988, ha mostrato che i metodi forniscono dei risultati coerenti. Tuttavia, secondo le caratteristiche fisiche della sostanza da saggiare, si può preferire l'uno o l'altro metodo.

1.2. SCELTA DEL METODO PIÙ APPROPRIATO

Allo scopo di scegliere il metodo più appropriato, è essenziale disporre di informazioni sulla solubilità, sulla tensione di vapore e sulle caratteristiche di adsorbimento del composto chimico. Dovrebbe essere nota la struttura chimica o la formula bruta per calcolare i valori teorici e/o per controllare i valori dei parametri significativi, per esempio ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOD, COD, misurati (si vedano gli allegati I e II).

I composti chimici da esaminare che sono solubili in acqua, ad una concentrazione di almeno 100 mg/l, possono essere valutati con tutti i metodi, a condizione che non siano volatili e non diano luogo a fenomeni di adsorbimento. Nella tabella n. 1 vengono riportati metodi idonei per quei composti chimici, volatili o adsorbibili, scarsamente solubili in acqua. Nell'allegato IH è descritto come si possono trattare i composti chimici scarsamente solubili in acqua e quelli volatili. Composti chimici moderatamente volatili possono essere controllati mediante il metodo di rimozione lenta del DOC se nei contenitori di prova si dispone di uno spazio gassoso sufficiente (che dovrebbe opportunamente tappato). In questo caso, è necessario eseguire anche un controllo abiotico per tener conto di eventuali perdite per fenomeni fisici.

▼B

Tabella 1

Applicabilità dei metodi di saggio

Saggio	Metodo analitico	Idoneità del metodo per sostanze:		
		scars. solub.	volatili	adsorbibili
Rimozione lenta DOC	Carbonio organico disciolto	—	—	+/–
Rimozione lenta OCSE modificato	Carbonio organico disciolto	—	—	+/–
Sviluppo CO_2	Respìrometria: sviluppo CO_2	+	—	+
Respirometria manometrica	Respirometria manometrica: consumo d'ossigeno	+	+/–	+
Bottiglia chiusa	Respirometria: ossigeno disciolto	+/–	+	+
MITI	Respirometria: consumo d'ossigeno	+	+/–	+

Per interpretare i risultati ottenuti, in particolare quando i valori di biodegradabilità sono bassi o marginali, è necessario acquisire ulteriori informazioni riguardo alla purezza e alle proporzioni relative dei componenti principali del materiale da saggiare.

Informazioni sulla tossicità del composto chimico da saggiare, nei confronti dei batteri (vedi allegato IV), possono essere molto utili per una scelta mirata della concentrazione da sottoporre a saggio e per una corretta interpretazione dei bassi valori di biodegradazione.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Allo scopo di verificare la procedura, si controllano prodotti chimici di riferimento che rispettano i criteri di pronta biodegradabilità installando un pallone apportuno in parallelo come parte delle normali prove sperimentali.

Composti chimici adatti sono anilina (distillata di fresco), acetato di sodio e benzoato di sodio. Questi prodotti chimici di riferimento si degradano tutti in questi metodi anche quando non si aggiunga deliberatamente inoculo.

È stato suggerito che si dovrebbe cercare un prodotto chimico di riferimento che sia facilmente biodegradabile, ma che richieda l'aggiunta di un inoculo, anche nel saggio della bottiglia chiusa. È stato proposto l'idrogenoftalato di potassio, ma mancano le prove per accettare questa sostanza come sostanza di riferimento.

Nei saggi respirometrici, i composti contenenti azoto possono influire sull'assorbimento di ossigeno a causa della nitrificazione (si vedano gli allegati II e V).

1.4. PRINCIPIO DEI METODI DI SAGGIO

Una soluzione, o sospensione, della sostanza in esame in un mezzo minerale viene inoculata e incubata in condizioni aerobiche al buio o a luce diffusa. La quantità di DOC introdotta nella soluzione con l'inoculo dovrebbe essere quanto più bassa possibile in paragone alla quantità di DOC dovuta alla sostanza in esame. Per valutare l'attività endogena dell'inoculo, si eseguono, in parallelo, dei saggi in bianco con l'inoculo ma senza sostanze in esame, in quanto l'attività endogena delle cellule, in presenza della sostanza, non si concilia esattamente con quella del controllo. Un saggio con una sostanza di riferimento viene eseguito in parallelo per valutare l'efficacia della procedura.

▼B

In generale, la degradazione viene seguita mediante la determinazione di parametri significativi, come DOC, produzione di CO_2 e consumo dell'ossigeno. Le misure vengono effettuate ad intervalli sufficientemente frequenti per permettere l'identificazione della biodegradazione dall'inizio alla fine. Con respirometri automatici, la misurazione è continua. Il DOC viene misurato in aggiunta ad un altro parametro, di solito all'inizio e al termine della prova. Si può anche utilizzare un'analisi chimica specifica per valutare la degradazione primaria della sostanza in esame e per determinare la concentrazione delle eventuali sostanze intermedie formate (questa analisi è obbligatoria nel saggio MITI).

Normalmente la prova dura 28 giorni. Tuttavia è possibile terminare il saggio prima dei 28 giorni, per esempio appena la curva della degradazione biologica ha raggiunto un livello stazionario per almeno tre determinazioni. Le prove possono anche essere prolungate oltre i 28 giorni quando la curva mostra che la biodegradazione è iniziata ma che non si è ancora raggiunto lo stato stazionario al 28° giorno.

1.5. CRITERIO DI QUALITÀ

1.5.1. **Riproducibilità**

A causa della natura della biodegradazione e delle popolazioni batteriche miste usate come inoculi, le determinazioni devono essere eseguite almeno in doppio.

È esperienza comune che quanto più grande è la concentrazione di microorganismi aggiunti inizialmente al mezzo colturale, tanto minori saranno le variazioni tra le repliche. Prove di intercalibrazione tra laboratori hanno mostrato che vi possono essere grandi variazioni tra i risultati ottenuti da differenti laboratori, ma normalmente si ottiene un buon accordo con composti chimici di riferimento facilmente biodegradabili.

1.5.2. **Validità del saggio**

Il saggio viene considerato valido se la differenza tra i valori estremi delle prove in multiplo di rimozione del composto chimico in esame al «plateau», alla fine del saggio o alla fine della fase di crescita (rime window) di 10 giorni, è minore del 20 % e se la degradazione percentuale della sostanza di riferimento ha raggiunto il livello corrispondente alla «pronta» biodegradabilità in 14 giorni. Se non si verifica una di queste condizioni, la prova deve venire ripetuta. Data la rigorosità dei metodi, bassi valori non significano necessariamente che la sostanza in esame non sia biodegradabile nell'ambiente, ma che sarà necessario ulteriore lavoro per definire la biodegradabilità.

Se in un saggio di tossicità, contenente sia la sostanza in esame che un composto chimico di riferimento, in 14 giorni si verifica una degradazione inferiore al 35 % (in base al DOC) o minore del 25 % (in base a ThOD o $ThCO_2$), si deve supporre che i composti chimici in esame siano inibitori (si veda anche l'allegato IV). Le prove dovrebbero essere ripetute, possibilmente con l'uso di una concentrazione minore di sostanza chimica in esame e/o una concentrazione più elevata di inoculo, ma non superiore a 30 mg per litro di solido.

1.6. PROCEDURE GENERALI E PREPARAZIONI

Le condizioni generali che valgono per le prove sono riassunte in Tabella 2. Le apparecchiature e le altre condizioni sperimentali valide per un particolare tipo di saggio sono descritte più avanti al paragrafo «saggio specifico».

▼B

Tabella 2

Condizioni sperimentali

Saggio	Rimozione lenta DOC	Sviluppo CO_2	Respirometria manometrica	Screenig OCSE tnodif.	Bottiglia chiuasa	MITI (I)
Concentrazione della sostanza in esame						
in mg/L			100		2-10	100
mg DOC/L	10-40	10-20		10-40		
mg ThOD/L			50-100		5-10	
Concentrazione dell'inoculo (in cellule/L, approssimata)	≤ 30 mg/l SS o ≤ 100 ml effluente/L (10^7-10^8)			0,5 ml effluente secondario/l- (10^5)	≤ 5 ml di effluente/L (10^4-10^6)	30 mg/l SS (10^7-10^8)
Concentrazione di elementi nel mezzo minerale (in mg/l):						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05-0,1				0,05-0,1	0,15
pH	7,4± 0,2					preferibilmente 7,0
Temperatura	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = carbonio organico disciolto ThoD = domanda teorica ossigeno SS = solidi sospesi

1.6.1. **Acqua di diluizione**

L'acqua deionizzata o distillata, esente da concentrazioni inibitrici di sostanze tossiche (per esempio ioni Cu^{++}), è usata come solvente. Essa deve contenere non oltre il 10 % del carbonio organico introdotto mediante il materiale in esame. L'elevata purezza dell'acqua per il saggio è necessaria per eliminare valori di bianco elevati. La contaminazione può essere dovuta a impurezze intrinseche, all'impiego di resine a scambio ionico o a materiale lisato proveniente da batteri e alghe. Per ciascuna serie di saggi usare una sola partita d'acqua, controllata preventivamente mediante analisi DOC. Detto controllo non è necessario per il saggio della bottiglia chiusa, perchè il consumo dì ossigeno da parte dei microorganismi dell'acqua sia basso.

▼B

1.6.2. **Soluzioni «stock» dei sali minerali**

Per preparare le soluzioni per il saggio, devono essere preventivamente preparate delle soluzioni «stock» di appropriata concentrazione dei sali minerali. Possono essere usate le seguenti soluzioni «stock» (con differenti fattori di diluizione) per i metodi: rimozione lenta DOC, screening OCSE modificato, sviluppo di CO_2, respirometria manometrica, saggio della bottiglia chiusa.

I fattori di diluizione e, per il saggio MITI, la preparazione specifica del mezzo minerale sono indicati nei saggi specifici.

Soluzioni «stock»:

Preparare le seguenti soluzioni «stock» utilizzando reagenti puri per analisi.

(a)	Diidrogenoortofosfato monopotassico, KH_2PO_4	8,50 g
	Monoidrogenoortofosfato dipotassico, K_2HPO_4	21,75 g
	Monoidrogenoortofosfato disodico diidrato Na_2HPO_4. 2 H_2O	33,40 g
	Cloruro d'ammonio, NH_4Cl	0,50 g
	Sciogliere in acqua e portare a 1 litroll pH della soluzione deve essere 7,4	
(b)	Cloruro di calcio anidro, $CaCl_2$	27,50 g
	O cloruro di calcio diidrato, $CaCl_2$- 2 H_2O	36,40 g
	Sciogliere in acqua e portare a 1 litro	
(c)	Solfato di magnesio eptaidrato, $MgSO_4$. 7 H_2O	22,50 g
	Sciogliere in acqua e portare a 1 litro	
(d)	Cloruro di ferro (III) esaidrato, $FeCl_3$. 6 H_2O	0,25 g
	Sciogliere in acqua e portare a 1 litro.	

Nota: allo scopo dì evitare di dover preparare questa soluzione immediatamente prima dell'uso, aggiungere una goccia di HCl concentrato o 0,4 g di acido etilendiamminotetra-acetico sale disodico (EDTA) per litro.

1.6.3. **Soluzioni «stock» di composti chimici**

Per esempio, sciogliere da 1 a 10 g, a seconda della sostanza chimica da saggiare o di riferimento in acqua deionizzata e portare a 1 litro quando la solubilità sia superiore a 1 g/l. Altrimenti, preparare soluzioni «stock» del mezzo minerale, oppure aggiungere la sostanza chimica direttamente al mezzo minerale. Per la solubilizza-zione dì composti chimici poco solubili, si veda l'allegato III, ma nel saggio MITI (Metodo C.4-F), non si devono usare nè solventi nè emulsionanti.

▼B

1.6.4. **Inoculi**

L'inoculo può essere ottenuto da varie fonti: fango attivo, acque di scarico (non clorate), acque superficiali e terreni, oppure da una miscela di questi. Per i saggi di rimozione lenta del DOC, sviluppo di CO_2 e respirometria manometrica, se si usa fango attivo esso dovrebbe essere prelevato da un impianto di trattamento 0 da una unità su scala di laboratorio che riceva principalmente scarichi domestici. Si è visto che gli inoculi provenienti da altre fonti danno luogo ad una dispersione maggiore dei risultati. Per lo screening OCSE modificato e per il saggio della bottiglia chiusa occorre un inoculo più diluito senza fiocchi di fango; la fonte preferita è un effluente secondario di un impianto di trattamento delle acque di rifiuto domestiche o una rispettiva unità su scala di laboratorio. Per il saggio MITI l'inoculo viene ricavato da una miscela di fanghi di diversa provenienza ed è descritto nel paragrafo di questo saggio specifico.

1.6.4.1. *Inoculo da fanghi attivi*

Raccogliere un campione di fango attivo fresco dal serbatoio di aereazione di un impianto di trattamento o da una unità pilota di laboratorio per il trattamento delle acque di scarico che tratti prevalentemente acque di origine domestica. Rimuovere, se necessario, le particelle grossolane mediante filtrazione attraverso un setaccio fine, e quindi mantenere il fango in condizioni aerobiche.

In alternativa, decantare o centrifugare (per esempio a 1 100 g per 10 minuti) dopo la rimozione di eventuali particelle grossolane. Scartare il surnatante. Il fango può essere lavato nel mezzo minerale. Sospendere il fango concentrato in mezzo minerale per ottenere una concentrazione di 3-5 g di solidi sospesi/l e aereare fino a quando è necessario.

Il fango dovrebbe essere prelevato da un impianto convenzionale ben funzionante. Se il fango è stato preso da un impianto ad alta potenzialità o si ritiene contenga inibitori dovrebbe essere lavato. Decantare o centrifugare il fango risospeso dopo accurata miscelazione, scartare il surnatante e risospendere il fango lavato in un volume ulteriore di terreno minerale. Ripetere questa procedura fino a quando il fango può essere considerato esente da eccesso di substrato e da inibitori.

Dopo avere ottenuto la completa risospensione, con fango non trattato, prelevare un'aliquota prima dell'uso per la determinazione del peso secco dei solidi sospensi.

Un'ulteriore alternativa è quella di omogeneizzare il fango attivo (3-5 g di solidi sospesi/l). Trattare il fango in un miscelatore meccanico per due minuti a velocità media. Decantare il fango miscelato per 30 minuti, o più a lungo se necessario, e utilizzare il liquido sovrastante per l'uso come inoculo nel rapporto di 10 ml/l nel mezzo minerale.

1.6.4.2. *Altre fonti di inoculo*

Esso può essere ottenuto da un effluente secondario di un impianto di trattamento o da una unità pilota di laboratorio che riceve prevalentemente scarichi domestici. Raccogliere un campione fresco e mantenerlo in condizioni aerobiche durante il trasporto. Lasciare decantare per 1 ora o filtrare con carta da filtro grossolana e mantenere l'effluente decantato o il filtrato in condizioni aerobiche fino a quando è necessario. Si possono usare fino a 100 ml di questo tipo di inoculo per litro di mezzo minerale.

▼B

Una fonte alternativa per l'inoculo è l'acqua superficiale. In questo caso, raccogliere un'idonea quantità di campione acqua superficiale, per esempio acqua di fiume, di lago, e mantenerla in condizioni aerobiche fino a quando è necessario. Se è il caso, concentrare l'inoculo mediante filtrazione o centrifugazione.

1.6.5. **Precondizionamento degli inoculi**

Gli inoculi possono essere precondizionati alle condizioni sperimentali, ma non preadattati al composto chimico in esame. Il precondizionamento consiste nell'aereare fango attivo nel mezzo minerale o effluente secondario per 5-7 giorni alla temperatura di prova. Il precondizionamento migliora tavolta la precisione dei metodi sperimentali riducendo i valori del bianco. Sì ritiene non necessario precondizionare l'inoculo nel metodo MITI.

1.6.6. **Controlli abiotici**

Quando è necessario, controllare la possibile degradazione abiotica della sostanza in esame determinando la rimozione di DOC, l'assorbimento di ossigeno o lo sviluppo di biossido di carbonio in controlli sterili che non contengono inoculo. La sterilizzazione può essere fatta mediante filtrazione attraverso una membrana (0,2- 0,45 micrometri), mediante l'aggiunta di una sostanza tossica di idonea concentrazione. Se viene usata una membrana filtrante, prelevare i campioni in modo asettico per mantenerli sterili. A meno che l'adsorbimento della sostanza chimica saggiata non sia risultato precedentemente assente, i saggi che misurano la biodegradazione come rimozione del DOC (carbonio organico disciolto), specialmente con inoculi a fanghi attivi, dovrebbero includere un controllo abiotico con inoculo tossico.

1.6.7. **Numero di contenitori usati in un saggio tipo**

Il numero di contenitori usati in una prova tipo è descritto nei rispettivi metodi di ciascun saggio.

Possono essere usati i seguenti tipi di contenitori:

— sospensione: contenente la sostanza per il saggio e l'inoculo

— bianco: contenente solo l'inoculo

— controllo: contenente la sostanza di riferimento e l'inoculo

— controllo abiotico sterile: contenente la sostanza per il saggio sterile (vedi 1.6.6.)

— controllo dell'adsorbimento: contenente la sostanza per il saggio, l'inoculo e l'agente sterilizzante

— controllo della tossicità: contenente la sostanza per il saggio, la sostanza di riferimento e l'inoculo

Le determinazioni nella sospensione in esame e nel bianco dovrebbero essere fatti in parallelo. È consigliabile effettuare le determinazioni in parallelo negli altri contenitori al meglio.

Tuttavia ciò non sempre è possibile. Assicurarsi che vengano prelevati un numero sufficiente di campioni o vengano effettuate un numero sufficiente di letture per permettere di valutare la rimozione percentuale nell'arco di 10 giorni.

▼B

1.7. DATI E VALUTAZIONE

Nel calcolo della degradazione percentuale (D_t), si utilizzano i valori medi delle misure in doppio del parametro significativo nei recipienti di prova e nel bianco dell'inoculo. Le formule sono rappresentate nei paragrafi relativi ai saggi specifici. L'andamento della degradazione viene illustrato graficamente e con l'indicazione della fase di crescita (time window) di 10 giorni. Calcolare e riportare la rimozione percentuale ottenuta al termine della fase di crescita (time window) di 10 giorni e il valore raggiunto nella fase di stabilizzazione o al termine della prova, a seconda dei casi.

Nelle prove respirometriche, i composti che contengono azoto possono influire sul consumo di ossigeno a causa della nitrificazione (si vedano gli allegati II e V).

1.7.1. **Misura della degradazione mediante determinazione del DOC**

La percentuale di degradazione nel tempo (D_t) dovrebbe essere calcolata separatamente nei recipienti contenenti la sostanza da esaminare usando i valori medi della misura in doppio del DOC perché il saggio possa avere significato. Ciò può essere calcolato usando la seguente equazione:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

dove:

D_t = degradazione % al tempo t,

C_o = concentrazione iniziale media di DOC nel mezzo di coltura inoculato contenente la sostanza in esame (mg DOC/1),

C_t = concentrazione media di DOC nel mezzo di coltura inoculato contenente la sostanza in esame al tempo t (mg DOC/1),

C_{bo} = concentrazione media iniziale di DOC ne! bianco del mezzo minerale inoculato (mg DOC/l),

C_{bt} = concentrazione media di DOC nel bianco del mezzo minerale inoculato al tempo t (mg DOC/l).

Tutte le concentrazioni sono misurate sperimentalmente.

1.7.2. **Misura della degradazione mediante analisi specifica**

Quando sono disponibili dati analitici specifici, calcolare la degradazione biologica primaria dalla relazione:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

dove:

D_t = degradazione % al tempo t, normalmente 28 giorni,

S_a = quantità residua di sostanza in esame nel terreno inoculato al termine della prova (mg),

S_b = quantità residua di sostanza in esame nella prova in bianco con acqua/mezzo minerale a cui è stata aggiunta solo la sostanza in esame (mg).

▼B

1.7.3. **Degradazione abiotica**

Se è usato un controllo abiotico sterile, calcolare la percentuale di degradazione abiotica usando:

$$\% \text{ didegradazione abiotica} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

dove

$C_{s(0)}$ = concentrazione del DOC nel controllo sterile al giorno 0,

$C_{s(t)}$ = concentrazione del DOC nel controllo sterile al giorno t.

1.8. RELAZIONE

La relazione del saggio deve, se possibile, contenere le seguenti informazioni:

— sostanze chimiche sperimentali di riferimento, e loro purezza,

— condizioni del saggio,

— inoculo: natura e località del campionamento, concentrazione ed eventuale trattamento di precondizionamento,

— proporzione e natura degli effluenti industriali presenti nelle acque di scarico, se note,

— tempi di conduzione del saggio e temperatura,

— nel caso di sostanze chimiche scarsamente solubili, il tipo di trattamento adottato,

— metodo di saggio applicato; dovrebbero essere fornite ragioni scientifiche e una spiegazione per eventuali modifiche alla procedura,

— registrazione dei dati,

— dovrebbero essere indicati eventuali fenomeni di inibizione osservati,

— eventuale degradazione abiotica osservata,

— dati analitici chimici specifici, se disponibili,

— dati analitici sugli intermedi, se disponibili,

— grafico della degradazione percentuale in funzione del tempo per le sostanze in esame e per quelle di riferimento; la fase di latenza, la fase di degradazione, la fase di crescita (rime window) di 10 giorni e la pendenza devono essere indicate chiaramente (allegato I). Se il saggio ha rispettato il criterio di validità, per il grafico può essere usata la media della percentuale di degradazione dei recipienti contenenti la sostanza da esaminare,

— la rimozione percentuale dopo la fase di crescita (time window) di 10 giorni, nonché. La stabilizzazione o il termine della prova.

PARTE II. **SAGGIO DI RIMOZIONE LENTA DEL DOC** (Metodo C.4-A)

II.1. PRINCIPIO DEL METODO

Un volume misurato del mezzo minerale inoculato, contenente una concentrazione nota della sostanza in esame (10-40 mg DOC/l) come unica fonte nominale di carbonio organico, viene aereato al buio o in luce diffusa a 22 ± 2 °C.

▼B

La degradazione viene seguita mediante analisi del DOC a intervalli regolari in un arco di tempo di oltre 28 giorni. Il grado di biodegradazione viene calcolato esprimendo la concentrazione di DOC rimossa (corretta del bianco di controllo dell'inoculo) in percento di concentrazione presente inizialmente. Il grado di degradazione biologica primaria può anche essere calcolato da una analisi chimica supplementare effettuata all'inizio e al termine dell'incubazione.

II.2. DESCRIZIONE DEL METODO

II.2.1. **Apparecchiatura**

a) Beute, per esempio, da 250 ml a 2 litri, secondo il volume necessario per l'analisi DOC;

b) tavola di agitazione — in grado di accogliere le beute, con controllo automatico della temperatura oppure disposta in un ambiente a temperatura costante — e di potenza tale da mantenere le condizioni aerobiche in tutte le beute;

c) apparecchio di filtrazione con membrane adatte;

d) analizzatore di DOC;

e) apparecchio per determinare l'ossigeno disciolto;

f) centrifuga.

II.2.2. **Preparazione del mezzo minerale**

Per la preparazione delle soluzioni concentrate vedi 1.6.2.

Miscelare 10 ml di soluzione (a) con 800 ml di acqua di diluizione, aggiungere 1 ml di soluzioni da (b) a (d) e portare a 1 litro con acqua di diluizione.

II.2.3. **Preparazione e precondizionamemo dell'inoculo**

L'inoculo può essere ottenuto da varie fonti: fango attivo, acque di scarico, acque superficiali e terreni, oppure da una miscela di questi.

Vedi I.6.4., 1.6.4.1., 1.6.4.2. e 1.6.5.

II.2.4. **Preparazione delle beute**

Introdurre, per esempio, porzioni da 800 ml di mezzo minerale in beute da 2 litri e aggiungere volumi sufficienti di soluzioni concentrate delle sostanze in esame e di riferimento a beute separate in modo da ottenere una concentrazione di sostanza chimica equivalente a 10-40 mg DOC/1. Controllare il valore del pH e correggerlo, se necessario, a pH = 7,4. Inoculare i palloni con fango attivo o altra fonte di inoculo (vedi I.6.4.), in modo da ottenere una concentrazione finale non superiore a 30 mg di solidi sospesi/l. Preparare inoltre controlli di inoculo in mezzo minerale senza il composto chimico in esame nè quello di riferimento.

Se necessario, usare un recipiente per controllare il possibile effetto inibitore della sostanza chimica in esame inoculando una soluzione contenente, nel mezzo minerale, concentrazioni confrontabili della sostanza chimica in esame e di quella di riferimento.

Inoltre, se richiesto, preparare un'ulteriore beuta sterile per controllare se la sostanza chimica in esame venga degradata abioticamente utilizzando una soluzione non inoculata della sostanza chimica (vedi 1.6,6.).

▼B

In aggiunta, se si sospetta che la sostanza chimica in esame sia adsorbita in modo significativo sul vetro, sul fango etc., effettuare una valutazione preliminare per determinare il grado probabile di adsorbimento e quindi l'idoneità del saggio per il composto chimico (vedi Tabella 1). Preparazione di un recipiente contenente la sostanza da esaminare, l'inoculo e l'agente sterilizzante.

Portare i volumi in tutte le beute a 11 con mezzo minerale, e, dopo miscelazione, prelevare un campione da ciascuna beuta per determinare la concentrazione iniziale di DOC (vedi allegato II.4). Coprire le aperture delle beute, per esempio, con un foglio di alluminio, in modo da permettere uno scambio libero di aria tra la beuta e l'atmosfera circostante. Inserire poi i contenitori nella tavola di agitazione e avviare il saggio.

II.2.5. **Numero di contenitori usati in un saggio tipo**

Recipiente 1 e 2: sospensione

Recipiente 3 e 4: bianco con inoculo

Recipiente 5: controllo

preferibilmente se è necessario:

Recipiente 6: controllo abiotico sterile

Recipiente 7: controllo per l'adsorbimento

Recipiente 8: controllo per la tossicità

Vedi I.6.7.

II.2.6. **Esecuzione del saggio**

Durante l'esecuzione del saggio, determinare la concentrazione di DOC in ciascuna beuta, in doppio, a intervalli di tempo noti, in modo sufficientemente regolare per poter determinare il momento di inizio della fase di crescita (time window) di 10 giorni e la rimozione percentuale al termine della fase dì crescita (time window) di 10 giorni. Prelevare solo il volume minimo necessario di sospensione di prova per ciascuna determinazione.

Prima del campionamento, compensare le perdite per evaporazione dalle beute mediante l'aggiunta di acqua di diluizione (I.6.1) nella quantità richiesta, se necessario. Miscelare il mezzo di coltura accuratamente prima di prelevare un campione e assicurarsi che il materiale eventualmente aderente alle pareti dei recipienti sia disciolto o sospeso prima del campionamento. Filtrare su membrana o centrifugare (vedi allegato II.4) immediatamente dopo aver prelevato il campione. Analizzare i campioni filtrati e centrifugati lo stesso giorno, altrimenti conservarli a 2-4 ^{o}C per un massimo di 48 ore o al di sotto di - 18 ^{o}C per un periodo più lungo.

II.3. DATI E RELAZIONE

II.3.1. **Modalità di esposizione dei risultati**

Calcolare la degradazione percentuale al tempo t come indicato al punto I.7.1. (determinazione del DOC) e (analisi specifica) punto I.7.2. facoltativa.

Trascrivere tutti i risultati su moduli predisposti.

▼B

II.3.2. **Validità dei risultati**

Vedi I.5.2.

II.3.3. **RELAZIONE**

Vedi 1.8.

II.4. MODULARIO

Nel seguito è presentato un esempio di modulo predisposto.

SAGGIO DI RIMOZIONE LENTA DEL DOC

1. **LABORATORIO**

2. **DATA DI INIZIO DEL SAGGIO**

3. **SOSTANZA CHIMICA IN ESAME**

Nome: ...

Concentrazione della soluzione stock: ... mg/l come sostanza

Concentrazione iniziale nel mezzo, t_0: ... mg/l come sostanza

4. **INOCULO**

Fonte: ...

Trattamento applicato: ...

Eventuale precondizionamento: ...

Concentrazione dei solidi sospesi nella miscela di reazione: ... mg/l

5. **DETERMINAZIONI DEL CARBONIO**

Analizzatore di carbonio: ...

	Beuta N.		DOC dopo n giorni (mg/L)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Sostanza chemica in esame più inoculo	1	a_1					
		a_2					
		a, media $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, media $C_{b(t)}$					

▼B

	Beuta N.		DOC dopo n giorni (mg/L)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Bianco dell'inoculo senza sostanza chemica in esame	3	C_1					
		C_2					
		C, media $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, media $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VALUTAZIONE DEI DATI GREZZI**

Beuta Nr		% degradazione dopo in giorni				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Media (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D_1 e D_2 non dovrebbero essere mediati se c'è notevole differenza tra loro.

Nota: formule simili possono essere usate per i controlli della sostanza chimica di riferimento e di tossicità.

7. **CONTROLLO ABIOTICO** (facoltativo)

	Tempo (in giorni)	
	0	t
DOC conc. in (mg/L) nel controllo sterile	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ didegradazione abiotica} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ANALISI SPECIFICA DEL COMPOSTO CHIMICO** (facoltativa)

	quantità residua della sostanza chimica alla fine del saggio	% di degradazione primaria
Controllo sterile	S_b	

▼B

	quantità residua della sostanza chimica alla fine del saggio	% di degradazione primaria
Saggio del mezzo inoculato	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTE III. **SAGGIO DI SCREENING OCSE MODIFICATO** (Metodo C.4-B)

III.l. PRINCIPIO DEL METODO

Un volume noto di mezzo minerale contenente una concentrazione nota della sostanza in esame (10-40 mg DOC/1) come unica fonte nominale di carbonio organico viene inoculato con 0,5 ml di effluente per litro di mezzo minerale. La miscela viene aerata al buio o in luce diffusa a 22 ± 2 °C.

La degradazione viene seguita mediante analisi del DOC a intervalli regolari in un arco di tempo di 28 giorni. Il grado di biodegradazione viene calcolato esprimendo la concentrazione dì DOC rimossa (corretta del bianco di controllo dell'inoculo) in percento della concentrazione presente inizialmente. Il grado di degradazione biologica primaria può anche essere calcolato mediante analisi chimica supplementare effettuata all'inizio e al termine dell'incubazione.

III.2. DESCRIZIONE DEL METODO

III.2.1. Apparecchiatura

a) Beute, per esempio da 250 ml a 2 litri, secondo il volume necessario per l'analisi del DOC;

b) tavola di agitazione — in grado di accogliere le beute, con controllo automatico della temperatura oppure disposta in un ambiente a temperatura costante — e di potenza sufficiente a mantenere le condizioni aerobiche in tutte le beute;

c) apparecchio di filtrazione con membrane adatte;

d) analizzatore di DOC;

e) apparecchio per determinare l'ossigeno disciolto;

f) centrifuga.

III.2.2. **Preparazione del mezzo minerale**

Per la preparazione delle soluzioni concentrate vedi I.6.2.

Miscelare 10 ml di soluzione (a) con 800 ml di acqua di diluizione, aggiungere 1 ml di soluzioni da (b) a (d) e portare a 1 litro con acqua di diluizione.

In questo metodo si utilizzano solo 0,5 ml di effluente/litro come inoculo e pertanto può essere necessario integrare il terreno con oligoelementi e fattori di crescita aggiungendo 1 ml per ciascuna delle seguenti soluzioni per litro di terreno finale.

▼B

Soluzione di oligoelementi:

Solfato di manganese tetraidrato, $MnSO_4$. $4H_2O$	39,9 mg
Acido borico, H_3BO_3	57,2 mg
Solfato di zinco eptaidrato, $ZnSO_4$. $7H_2O$	42,8 mg
Eptamolibdato d'ammonio, $(NH_4)_6$ MO_7O_{24}	34,7 mg
Chelato di Fe ($FeCl_3$ acido etilendiammino-tetraacetico)	100,0 mg

Sciogliere in un matraccio e portare a 1 000 ml con acqua di diluizione.

Soluzione di vitamine:

Estratto di lievito	15,0 mg

Sciogliere l'estratto di lievito in 100 ml di acqua e sterilizzare attraverso una membrana da 0,2 micron, preparare la soluzione al momento dell'uso.

III.2.3. **Preparazione e precondizionamento dell'inoculo**

L'inoculo è ottenuto da un effluente secondario di un impianto di trattamento o da un'unità pilota di laboratorio alimentata prevalentemente da scarichi domestici.

È usato in ragione di 0,5 ml/l di mezzo minerale. Vedi I.6.4.2. e I.6.5.

III.2.4. **Preparazione dei contenitori**

Introdurre, per esempio, porzioni da 800 ml di mezzo minerale in beute da 2 litri e aggiungere volumi sufficienti di soluzioni stock delle sostanze in esame e di riferimento a beute separate in modo da ottenere una concentrazione di sostanza chimica equivalente a 10-40 mg DOC/l. Controllare il valore del pH e correggerlo, se necessario, a pH = 7,4. Inoculare le beute con effluente di acque di scarico (0,5 ml/litro) (vedi I.6.4.2.). Preparare inoltre controlli dell'inoculo nel mezzo minerale senza le sostanze chimiche in esame e di riferimento.

Se necessario, usare un recipiente per controllare il possibile effetto inibitore della sostanza chimica in esame inoculando una soluzione contenente, nel mezzo minerale, concentrazioni confrontabili della sostanza chimica in esame e di quella di riferimento.

Inoltre, se richiesto, preparare un'ulteriore beuta sterile per controllare se la sostanza chimica in esame venga degradata abioticamente utilizzando una soluzione non inoculata della sostanza chimica (vedi I.6.6.).

In aggiunta, se si sospetta che la sostanza chimica in esame sia adsorbita in modo significativo sul vetro, sul fango ecc, effettuare una valutazione preliminare per determinare il grado probabile di adsorbimento e quindi l'idoneità del saggio per il composto chimico (vedi Tabella 1). Preparazione di un recipiente contenente la sostanza da esaminare, l'inoculo e l'agente sterilizzante.

Portare i volumi in tutte le beute a 1 l con mezzo minerale, e, dopo miscelazione, prelevare un campione da ciascuna beuta per determinare la concentrazione iniziale di DOC (vedi allegato II.4). Coprire le aperture delle beute, per esempio con un foglio di alluminio, in modo da permettere uno scambio libero di aria tra la beuta e l'atmosfera circostante. Inserire poi i recipienti nella tavola di agitazione e avviare il saggio.

▼B

III.2.5. **Numero di contenitori usati in una prova tipo**

Recipiente 1 e 2: sospensione

Recipiente 3 e 4: bianco con inoculo

Recipiente 5: controllo

preferibilmente se è necessario:

Recipiente 6: controllo abiotico sterile

Recipiente 7: controllo per l'adsorbimento

Recipiente 8: controllo per la tossicità

Vedi 1.6.7.

III.2.6. **Esecuzione del saggio**

Durante l'esecuzione del saggio, determinare la concentrazione di DOC in ciascuna beuta, in doppio, a intervalli di tempo noti, in modo sufficientemente regolare per poter determinare il momento di inizio della fase di crescita (time window) di 10 giorni e la rimozione percentuale al termine della fase di crescita (time window) di 10 giorni. Prelevare solo il volume mìnimo necessario dì sospensione di prova per ciascuna determinazione.

Prima del campionamento, compensare le perdite per evaporazione dalle beute mediante l'aggiunta di acqua di diluizione (I.6.1), se necessario, nella quantità richiesta. Miscelare il mezzo di coltura accuratamente prima di prelevare un campione e assicurarsi che il materiale eventualmente aderente alle pareti dei recipienti sia disciolto o sospeso prima del campionamento. Filtrare su membrana o centrifugare (vedi allegato II.4) immediatamente dopo aver prelevato il campione. Analizzare i campioni filtrati e centrifugati lo stesso giorno, altrimenti conservarli a 2-4 ^{o}C per un massimo di 48 ore o al di sotto di - 18 ^{o}C per un periodo più lungo.

III.3. DATI E RELAZIONE

III.3.1. **Trattamento dei risultati**

Calcolare la degradazione percentuale al tempo t come indicato al punto I.7.1. (determinazione del DOC) e, facoltativamente, al punto I.7.2. (analisi specifica).

Trascrivere tutti i risultati su moduli predisposti.

III.3.2. **Validità dei risultati**

Vedi I.5.2.

III.3.3. **RELAZIONE**

Vedi I.8.

III.4. MODULARIO

Nel seguito è presentato un esempio di modulo.

SAGGIO DI RIMOZIONE LENTA DEL DOC SCREENING OCSE MODIFICATO

1. **LABORATORIO**

2. **DATA DI INIZIO DEL SAGGIO**

▼B

3. **SOSTANZA IN ESAME**

Nome: ...

Concentrazione della soluzione stock: ... mg/l come sostanza

Concentrazione iniziale nel mezzo, t_o: ... mg/l come sostanza

4. **INOCULO**

Fonte: ...

Trattamento applicato: ... mg/l

Eventuale precondizionamento: ...

Concentrazione dei solidi sospesi nella miscela di reazione: ... mg/l

5. **DETERMINAZIONI DEL CARBONIO**

Analizzatore di carbonio: ...

	Beuta N.		DOC dopo n giorni (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_4
Sostanza chimica in esame più inoculo	1	a_1					
		a_2					
		a, media $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, media $C_{b(t)}$					
Bianco dell'inoculo senza sostanza chimica in esame	3	c_1					
		c_2					
		c, media $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, media $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VALUTAZIONE DEI DATI GREZZI**

Beuta n.		% degradazione dopo n giorni				
		0	n_1	n_2	n_3	n_4
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Beuta n.		% degradazione dopo n giorni				
		0	n_1	n_2	n_3	n_4
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Media (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D_1 e D_2 non dovrebbero essere mediati se c'è notevole differenza tra loro.

Nota: formule simili possono essere usate per i controlli della sostanza chimica di riferimento e di tossicità.

7. **CONTROLLO ABIOTICO** (facoltativo)

	Tempo (in giorni)	
	0	t
DOC conc. in mg/L nel controllo sterile	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ didegradazione abiotica} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ANALISI SPECIFICA DEL COMPOSTO CHIMICO** (facoltativa)

	quantità residua della sostanza chimica alla fine del saggio	% di degradazione primaria
Controllo sterile	S_b	
Saggio del mezzo inoculato	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTE IV. SAGGIO DI SVILUPPO DEL CO_2 (Metodo C.4-C)

IV.1. PRINCIPIO DEL METODO

Un volume misurato di mezzo minerale inoculato contenente una concentrazione nota della sostanza chimica in esame (10-20 mg DOC o TOC/l) come unica fonte nominale di carbonio organico, viene aerato mediante il passaggio di aria esente da biossido di carbonio ad una portata controllata, al buio o a luce diffusa. La degradazione viene seguita per 28 giorni determinando il biossido di carbonio prodotto, che viene assorbito su idrossido di bario o di sodio e che viene misurato per titolazione dell'idrossido di bario residuo o come carbonio inorganico. La quantità di biossido di carbonio prodotta dalla sostanza chimica in esame (corretta, per tener conto di quella derivante dal bianco dell'inoculo) viene espressa come percentuale di $ThCO_2$. Il grado di degradazione biologica può anche essere calcolato da un'analisi DOC supplementare effettuata all'inizio e al termine dell'incubazione.

▼B

IV.2. DESCRIZIONE DEL METODO

IV.2.1. **Apparecchiatura**

a) Palloni, 2-5 litri, dotati ciascuno di un tubo di aerazione che giunge quasi al fondo del recipiente e di una uscita;

b) agitatori magnetici quando la valutazione viene effettuata su sostanze chimiche scarsamente solubili;

c) bottiglie per l'assorbimento di gas;

d) dispositivo per controllare e misurare il flusso d'aria;

e) apparecchio per la rimozione del biossido di carbonio per la preparazione d'aria esente da biossido di carbonio; in alternativa, una miscela di ossigeno esente da CO_2 e azoto esente da CO_2 prelevata da bombole di gas nelle proporzioni corrette (20 % O_2:80 % N_2);

f) dispositivo per la determinazione del biossido di carbonio, o per titolazione o mediante qualche tipo di analizzatore del carbonio inorganico;

g) dispositivo di filtrazione su membrana (facoltativo);

h) analizzatore del DOC (facoltativo).

IV.2.2. **Preparazione del mezzo minerale**

Per la preparazione delle soluzioni concentrate vedi I.6.2.

Miscelare 10 ml di soluzione (a) con 800 ml di acqua di diluizione, aggiungere 1 ml di soluzioni da (b) a (d) e portare a 1 litro con acqua di diluizione.

IV.2.3. **Preparazione e precondizionamento dell'inoculo**

L'inoculo può essere ottenuto da varie fonti: fango attivo, acque di scarico, acque superficiali e terreni, oppure da una miscela di questi.

Vedi I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. e I.6.5.

IV.2.4. **Preparazione dei contenitori**

Per esempio, i seguenti volumi e pesi indicano i valori per palloni da 5 litri contenenti 3 litri di sospensione. Se si utilizzano volumi più piccoli, modificare proporzionatamente i valori, ma assicurarsi che il biossido di carbonio formato possa venire misurato con accuratezza.

In ciascun pallone da 5 litri introdurre 2 400 ml di mezzo minerale. Aggiungere un volume appropriato del fango attivo preparato (vedi I.6.4.1. e I.6.5.) in modo da ottenere una concentrazione di solidi sospesi non maggiore di 30 mg/l nei 3 litri finali di miscela inoculata. In alternativa, diluire per prima cosa il fango preparato in modo da ottenere una sospensione a 500-1 000 mg/l nel mezzo minerale prima di aggiungerne un'aliquota al contenuto del pallone da 5 litri per realizzare una concentrazione di 30 mg/l; questo assicura una maggior precisione. È possibile usare altre fonti di inoculo (vedi I.6.4.2.).

Aerare queste miscele inoculate con aria esente da CO_2 per una notte in modo da bonificare il sistema dal biossido di carbonio.

▼B

Aggiungere il materiale in esame e la sostanza di riferimento, separatamente, come volumi noti delle soluzioni concentrate ai palloni in multiplo, in modo da ottenere concentrazioni, fornite dalle sostanze chimiche aggiunte, da 10 a 20 mg di DOC o TOC/l; lasciare alcuni palloni senza aggiunta di sostanze chimiche come controlli dell'inoculo. Aggiungere le sostanze chimiche in esame, scarsamente solubili, direttamente nei palloni in una percentuale in peso o in volume, oppure trattarle come descritto nell'allegato III.

Se richiesto, usare un pallone per controllare il possibile effetto inibitore della soluzione chimica in esame aggiungendo le sostanze chimiche in esame e di riferimento alle stesse concentrazioni alle quali sono presenti negli altri palloni.

Inoltre, se richiesto, utilizzare un pallone sterile per controllare se la sostanza chimica in esame venga degradata abioticamente, utilizzando una soluzione non inoculata della sostanza chimica (vedi I.6.6.). Sterilizzare mediante l'aggiunta di una sostanza tossica ad una idonea concentrazione.

Portare i volumi delle sospensioni in tutti i palloni a 3 l mediante l'aggiunta del mezzo minerale preventivamente aerato con aria esente da CO_2. In alternativa, si possono prelevare dei campioni per l'analisi del DOC (vedi allegato II.4.) e/o per l'analisi specifica. Collegare le bottiglie di assorbimento alle uscite dell'aria dei palloni.

Se si utilizza idrossido di bario, collegare tre bottiglie di assorbimento, contenenti ciascuna 100 ml di soluzione 0,0125 M di idrossido di bario, in serie con ciascun pallone da 5 l. La soluzione deve essere esente da solfati e carbonati precipitati e la sua concentrazione deve essere determinata immediatamente prima dell'uso. Se si utilizza idrossido di sodio, collegare due recipienti di cattura, dove il secondo agisce da controllo per verificare che tutto il biossido di carbonio è stato assorbito nel primo. Sono adatte bottiglie di assorbimento con chiusure per bottiglie da siero. Aggiungere 200 ml di idrossido di sodio 0,05 M a ciascuna bottiglia, quantità sufficiente per assorbire la quantità totale di biossido di carbonio sviluppata quando la sostanza chimica in esame è completamente degradata. La soluzione di idrossido di sodio, anche quando è stata preparata di fresco, conterrà tracce di carbonati; questo valore viene corretto sottraendo il carbonato contenuto nel bianco.

IV.2.5. **Numero di palloni usati in un saggio tipo**

Recipiente 1 e 2: sospensione

Recipiente 3 e 4: bianco con inoculo

Recipiente 5: controllo

preferibilmente se è necessario:

Recipiente 6: controllo abiotico sterile

Recipiente 7: controllo per la tossicità

Vedi I.6.7.

IV.2.6. **Esecuzione del saggio**

Iniziare la prova facendo gorgogliare aria esente da CO_2 attraverso le sospensioni ad una portata di 30-100 ml/min. Prelevare periodicamente dei campioni dal contenitore che assorbe il biossido di carbonio per l'analisi del contenuto di CO_2. Durante i primi 10 giorni si raccomanda di effettuare l'analisi ogni due o tre giorni, poi ogni cinque giorni fino al ventottesimo giorno in modo da poter identificare la fase di crescita (time window) di 10 giorni.

▼B

Al ventottesimo giorno, prelevare dei campioni (facoltativamente) per l'analisi del DOC e/o l'analisi specifica, misurare il pH delle sospensioni e aggiungere 1 ml di acido cloridrico concentrato a ciascun contenitore; aerare i contenitori per una notte per scacciare il biossido di carbonio presente nelle, sospensioni in esame. Al giorno ventinovesimo eseguire l'ultima analisi del biossido di carbonio sviluppato.

Nei giorni di misura del CO_2, scollegare l'assorbitore dell'idrossido di bario più vicino al pallone e titolare la soluzione di idrossido con HCl 0,05 M utilizzando fenolftaleina come indicatore. Spostare gli assorbitori rimanenti di un posto verso il pallone e porre un nuovo assorbitore contenente 100 ml di idrossido di bario 0,0125 M fresco all'estremità più lontana della serie. Effettuare le titolazioni quando necessario, per esempio quando si vede una sostanziale precipitazione nella prima trappola e prima che sia evidente una precipitazione nella seconda, oppure almeno ogni settimana. In alternativa, con NaOH come assorbente, prelevare con una siringa una piccola aliquota di campione (secondo le caratteristiche dell'analizzatore di carbonio usato) della soluzione di idrossido di sodio nell'assorbitore più vicino al pallone. Iniettare il campione nella parte per il carbonio inorganico dell'analizzatore di carbonio ed effettuare direttamente l'analisi del biossido di carbonio sviluppato.

Analizzare il contenuto della seconda trappola solo al termine del saggio per correggere eventuali trascinamenti di biossido di carbonio.

IV.3. DATI E RELAZIONE

IV.3.1. **Modalità di esposizione dei risultati**

La quantità di CO_2 catturata nell'assorbitore al momento della titolazione è data da:

$$\text{mg } CO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

in cui:

V = volume di HCl utilizzato per la titolazione dei 100 ml nell'assorbitore (ml),

C_B = concentrazione della soluzione di idrossido di bario (M),

C_A = concentrazione della soluzione di acido cloridrico (M),

se C_B è 0,0125 MeCA è 0,05 M, la titolazione per 100 ml di idrossido di bario è 50 ml e il peso di CO_2 è dato da:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml HCl titolato} = 1{,}1 \times \text{ml HCl}$$

Così, in questo caso, il fattore di conversione del volume di HCl titolato in mg di CO_2 prodotta è 1,1.

Calcolare i pesi di CO_2 prodotto dall'inoculo da solo e dall'inoculo più la sostanza chimica in esame utilizzando i rispettivi valori di titolazione; la differenza è il peso di CO_2 prodotto dalla sostanza chimica in esame da sola.

Per esempio, se l'inoculo da solo fornisce una titolazione di 48 ml e l'inoculo più sostanza chimica in esame fornisce 45 ml.

CO_2 dall'inoculo = $1{,}1 \times (50 - 48) = 2{,}2$ mg

▼B

CO_2 dall'inoculo più sostanza chimicain esame= 1,1 × (50 - 45) = 5,5 mg

e così il peso di CO_2 prodotto dalla sostanza chimica in esame è 3,3 mg.

La degradazione biologica percentuale si calcola da:

$$\% \text{ degradazione} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ prodotti} \times 100}{\text{Th}CO_2\text{prodotti} \times \text{mgdi sostanza chimica in esame aggiunta}}$$

o,

$$\% \text{ degradazione} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ prodotti} \times 100}{\text{mg TOC aggiunti nella prova} \times 3{,}67}$$

dove 3,67 è il fattore di conversione (44/12) da carbonio a biossido di carbonio.

Ricavare la degradazione percentuale dopo ogni intervallo di tempo aggiungendo la percentuale dei valori di $ThCO_2$ calcolati per ciascuno dei giorni in cui è stata misurata fino a quel momento.

Per gli assorbitori all'idrossido di sodio, calcolare la quantità di biossido di carbonio prodotto, espressa come 1C (mg), moltiplicando la concentrazione di IC nell'assorbente per il volume dell'assorbente.

Calcolare la degradazione percentuale dalla:

$$\% \text{ Th}CO_2 = \frac{\text{mg IC del pallone di prova} - \text{mg IC del bianco}}{\text{mg TOC aggiunti come sostanza chimica in esame}} \times 100$$

Calcolare il grado di rimozione del DOC (facoltativo) come descritto al punto 1.7. Registrare questi risultati, e tutti gli altri, sui registri forniti.

IV.3.2. **Validità dei risultati**

Il contenuto di carbonio inorganico nella sospensione della sostanza chimica in esame nel mezzo minerale all'inizio della prova deve essere minore del 5 % del carbonio totale e lo sviluppo totale di CO_2 nel bianco dell'inoculo al termine della prova non dovrebbe normalmente superare i 40 mg/l di terreno. Se si ottengono valori maggiori di 70 mg CO_2/l, si dovrebbero esaminare criticamente i dati e la tecnica sperimentale.

Vedi anche I.5.2.

IV.3.3. **Relazione**

Vedi I.8.

IV.4. MODULARIO

Nel seguito è presentato un esempio di modulo predisposto.

SAGGIO DI SVILUPPO DEL BIOSSIDO DI CARBONIO

1. **LABORATORIO**

2. **DATA DI INIZIO DEL SAGGIO**

3. **SOSTANZA IN ESAME**

Nome: ...

Concentrazione della soluzione stock: ... mg/l come sostanza

▼B

Concentrazione iniziale nel mezzo: ... mg/l come sostanza

C totale aggiunto al contenitore: ... mg C

$ThCO_2$: ... mg CO_2

4. **INOCULO**

Fonte: ...

Trattamento effettuato: ...

Eventuale precondizionamento: ...

Concentrazione dei solidi sospesi nella miscela di reazione: ... mg/l

5. **PRODUZIONE DI BIOSSIDO DI CARBONIO E DEGRADABILITÀ**

Metodo: $Ba(OH)_2$/NaOH/altro: ...

Tempo (giorno)	CO_2 formato prova (mg)		CO_2 formato bianca (mg)		CO_2 formato kumulativo (mg)		% $ThCO_2$ cumulativo $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	media	3 / 4	media	1	2	1	2	media
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Nota: formati simili possono essere usati per i controlli della sostanza chimica di riferimento e di tossicità.

6. **ANALISI DEL CARBONIO** (facoltativa)

Analizzatore di carbonio:

Tempo (giorno)	Bianco mg/l	Sostanza chimica in esame mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) 0 al termine dell'incubazione

▼B

$$\% \text{ DOC rimosso} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_t - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **DEGRADAZIONE ABIOTICA** (facoltativa)

$$\% \text{ degradazione abiotica} = \frac{\text{Formazione di } CO_2 \text{ contenitore sterile dopo 28giorni (mg)}}{ThCO_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

PARTE V. **SAGGIO RESPIROMETRICO MANOMETRICO** (Metodo C.4-D)

V. 1. PRINCIPIO DEL METODO

Un volume misurato di mezzo minerale inoculato, contenente una concentrazione nota della sostanza chimica in esame (100 mg/l della sostanza chimica in esame in modo da fornire almeno 50-100 mg ThOD/1) come unica fonte nominale di carbonio organico, viene tenuto sotto agitazione in un contenitore chiuso a temperatura costante (± 1 °C o meno) per un tempo fino a 28 giorni. Il consumo di ossigeno viene determinato o misurando la quantità di ossigeno (prodotto elettroliticamente) necessario per mantenere costante il volume di gas nel contenitore del respirometro, oppure dalla variazione di volume o di pressione (o da una combinazione delle due variazioni) nell'apparecchiatura. Il biossido di carbonio sviluppato viene assorbito in una soluzione di idrossido di potassio o un altro assorbente adatto. La quantità di ossigeno consumata dalla sostanza chimica in esame (corretta del consumo del bianco dell'inoculo, controllato in parallelo) viene espressa in percentuale di ThOD o COD. In alternativa, la degradazione primaria può anche essere calcolata mediante analisi specifica supplementare fatta all'inizio e alla fine dell'incubazione e la degradazione ultima mediante analisi del DOC.

V.2. DESCRIZIONE DEL METODO

V.2.1. **Apparecchiatura**

a) Adatto respirometro;

b) sistema di regolazione della temperatura che mantenga ± 1 °C, o miglio;

c) dispositivo di filtrazione su membrana (facoltativo);

d) analizzatore di carbonio (facoltativo).

V.2.2. **Preparazione del mezzo minerale**

Per la preparazione delle soluzioni concentrate vedi I.6.2.

Miscelare 10 ml di soluzione (a) con 800 ml di acqua di diluizione, aggiungere 1 ml di soluzioni da (b) a (d) e portare a 1 litro con acqua di diluizione.

V.2.3. **Preparazione e precondizionamento dell'inoculo**

L'inoculo può essere ottenuto da varie fonti: fango attivo, acque di scarico, acque superficiali e terreni, oppure da una miscela di questi.

Vedi I.6.4., 1.6.4.1., I.6.4.2. e I.6.5.

V.2.4. **Preparazione dei contenitori**

Preparare separatamente le soluzioni delle sostanze chimiche in esame e di riferimento nel mezzo minerale, normalmente equivalenti ad una concentrazione di 100 mg di sostanza chimica/1 (che forniscono almeno 50-100 mg ThOD/1) utilizzando le soluzioni concentrate (stock).

▼B

Calcolare la ThOD sulla base della formazione di sali di ammonio, salvo che si preveda una nitrificazione, nel qual caso il calcolo dovrebbe essere basato sulla formazione di nitrati (vedi allegato H.2.).

Determinare i valori di pH e, se necessario, regolare a pH = 7,4± 0,2.

Sostanze scarsamente solubili dovrebbero essere aggiunte in una fase più avanzata (vedi nel seguito).

Se si deve determinare la tossicità della sostanza chimica in esame, preparare una ulteriore soluzione nel mezzo minerale contenente sia la sostanza chimica in esame che quella di riferimento alle stesse concentrazioni delle singole soluzioni.

Se è richiesta una misura dell'assorbimento chimico-fisico dell'ossigeno, preparare una soluzione sterile della sostanza chimica in esame ad una concentrazione, normalmente, di 100 mg ThOD/1 mediante aggiunta di una idonea sostanza tossica (vedi I.6,6.).

Introdurre il volume richiesto di soluzione delle sostanze chimiche rispettivamente in esame e di riferimento, in contenitori almeno in doppio. Aggiungere ad ulteriori contenitori il mezzo minerale da solo (per i controlli dell'inoculo) e, se richiesto, la soluzione mista della sostanza chimica di prova/riferimento e la soluzione sterile.

Se la sostanza chimica in esame è scarsamente solubile, aggiungerla direttamente a questo stadio, in ragione del peso o del volume, oppure trattarla come descrino nell'allegato III. Nel comparto di assorbimento della CO_2, aggiungere idrossido di potassio, pastiglie di calce sodata o altro assorbente.

V.2.5. **Numero di contenitori usati in un saggio tipo**

Recipiente 1 e 2: sospensione

Recipiente 3 e 4: bianco con inoculo

Recipiente 5: controllo

preferibilmente se è necessario:

Recipiente 6: controllo sterile

Recipiente 7: controllo per la tossicità

Vedi I.6.7.

V.2.6. **Esecuzione del saggio**

Aspettare che i contenitori abbiano raggiunto la temperatura desiderata, inoculare i recipienti appropriati con fango attivo preparato o altra fonte di inoculo in modo da ottenere una concentrazione di solidi sospesi non superiore a 30 mg/l. Montare l'apparecchiatura, avviare l'agitatore e controllare la tenuta nei confronti dell'aria, e iniziare la misura del consumo di ossigeno. Di solito non sono richieste ulteriori attenzioni a parte quella di effettuare le necessarie letture e i controlli giornalieri per verificare che vengano mantenute la temperatura corretta ed una adeguata agitazione.

Calcolare il consumo di ossigeno con letture effettuate ad intervalli regolari e frequenti, utilizzando i metodi forniti dal fabbricante dell'apparecchiatura. Al termine dell'incubazione, normalmente 28 giorni, misurare il pH del contenuto dei contenitori, sopratutto se il consumo di ossigeno è basso o maggiore della $ThOD_{NH4}$ (vedi composti contenenti azoto).

▼B

Se necessario, prelevare campioni dai contenitori del respirometro, all'inizio e alla fine, per l'analisi del DOC o per l'analisi chimica specifica (vedi allegato II.4.). Al momento del prelievo iniziale, assicurarsi che il volume della sospensione in esame che rimane nel contenitore sia noto. Quando l'ossigeno viene consumato da una sostanza in esame contenente azoto, determinare l'aumento della concentrazione dei nitriti e dei nitrati durante i 28 giorni e calcolare la correzione per l'ossigeno consumato mediante nitrificazione (allegato V).

V.3. DATI E RELAZIONE

V.3.1. **Modalità di esposizione dei risultati**

Dividere il consumo di ossigeno (mg) da parte della sostanza chimica in esame dopo un tempo stabilito (corretto del controllo del bianco di inoculo dopo lo stesso tempo) per il peso della sostanza chimica in esame usata. Questo fornisce il BOD espresso come mg di ossigeno/mg di sostanza chimica in esame, cioè

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ consumato dalla sostanza chimica in esame} - \text{mg } O_2 \text{ consumato dal bianco})}{(\text{mg sostanza chimica in esame nel contenitore})}$$

= mg O_2 per mg di sostanza chimica in esame.

Calcolare la percentuale di degradazione biologica con una delle seguenti relazioni:

$$\%\ \text{degrad. biologica} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg sostanza chimica})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2/\text{mg sostanza chimica})} \times 100$$

o

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg sostanza chimica})}{\text{COD}(\text{mg } O_2/\text{mg sostanza chimica})} \times 100$$

Si dovrebbe notare che questi due metodi non forniscono necessariamente lo stesso valore; dei due è preferibile usare il primo.

Per le sostanze in esame che contengono azoto, utilizzare il valore appropriato di ThOD (NH_4 o NO_3) secondo quanto è noto o ci si aspetta per quanto riguarda il verificarsi della nitrificazione (allegato II.2). Se viceversa si verifica una nitrificazione non completa, effettuare una correzione che tenga conto dell'ossigeno consumato dalla nitrificazione in base alle variazioni di concentrazione dei nitriti e dei nitrati (allegato V).

Quando si effettuano determinazioni facoltative del carbonio organico e/o di una sostanza chimica specifica, calcolare la degradazione percentuale come descritto al punto I.7.

V.3.2. **Validità dei risultati**

Il consumo di ossigeno da parte del bianco dell'inoculo è normalmente di 20-30 mg O_2/l e non dovrebbe essere maggiore di 60 mg/l in 28 giorni. Valori più elevati di 60 mg/l richiedono un esame critico dei dati e delle tecniche sperimentali. Se il valore del pH è al di fuori del campo 6-8,5 ed il consumo di ossigeno da parte della sostanza chimica in esame è minore del 60 %, si dovrebbe ripetere la prova con una minore concentrazione della sostanza chimica in esame.

Vedi anche I.5.2.

▼B

V.3.3. **Relazione**

Vedi I.8.

V.4. **MODULARIO**

Nel seguito è presentato un esempio di modulo predisposto.

SAGGIO RESPIROMETRICO MANOMETRICO

1. **LABORATORIO**

2. **DATA DI INIZIO DEL SAGGIO**

3. **SOSTANZA IN ESAME**

Nome: ...

Concentrazione della soluzione stock: ... mg/l

Concentrazione iniziale nel mezzo, C_o: ... mg/l

Volume nel recipiente di saggio (V): ... ml

ThOD o COD: ... mg O_2/mg sostanza saggiata (NH_4, NO_3)

4. **INOCULO**

Fonte: ...

Trattamento effettuato: ...

Eventuale precondizionamento: ...

Concentrazione dei solidi sospesi nella miscela di reazione: ... mg/l

5. **CONSUMO DI OSSIGENO: BIODEGRADABILITÀ**

		Tempo (giorni)											
		0		7		14			21			28	
O_2 cons. (mg) sostanza chimica in esame	1												
	2												
	a, media												
O_2 cons. (mg) bianco	3												
	4												
	b, media												
BOD (mg) corretto	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BOD per mg di sostanza chimica in esame	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Tempo (giorni)											
		0		7		14			21			28	
% degradazione	D_1 (a_1)												
$\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_2 (a_2)												
	Media (*)												

V = Volume del mezzo nel contenitore d'esame
(*) D_1 e D_2 non dovrebbero essere mediati se c'è notevole differenza tra loro.

Nota: formule simili possono essere usate per i controlli della sostanza chimica di riferimento e per i controlli di tossicità.

6. **CORREZIONE PER LA NITRIFICAZIONE** (vedi allegato V)

Giorno		0	28	Differenza
(i)	Concentrazione nitrati (mg N/l)			(N)
(ii)	Ossigeno equivalente (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
(iii)	Concentrazione nitriti (mg N/l)			(N)
(iv)	Ossigeno equivalente (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
(ii + iv)	Ossigeno equivalente totale	—	—	

7. **ANALISI DEL CARBONIO** (facoltativa)

Analizzatore di carbonio: ...

Tempo (giorno)	Bianco mg/l	Sostanza chimica in esame mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_o
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) o al termine dell'incubazione

$$\% \text{ DOC rimosso} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SOSTANZA CHIMICA SPECIFICA** (facoltativa)

S_b = concentrazione nel controllo chimico-fisico (sterile) al ventottesimo giorno.

S_a = concentrazione nel pallone inoculato al ventottesimo giorno.

$$\% \text{ biodegradazione} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **DEGRADAZIONE ABIOTICA** (facoltativa)

a = consumo di ossigeno nei contenitori sterili dopo 28 giorni, (mg).

$$\text{consumo di ossigeno per mg di sostanza chimica in esame} = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(vedi sezioni 1 e 3)

$$\% \text{ degradazione abiotica} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

PARTE VI. **SAGGIO DELLA BOTTIGLIA CHIUSA** (Metodo C.4-E)

VI.l. PRINCIPIO DEL METODO SPERIMENTALE

La soluzione della sostanza chimica in esame nel mezzo minerale, di solito a 2-5 mg/l, viene inoculata con un numero relativamente piccolo di microorganismi provenienti da una popolazione mista e mantenuti in bottiglie chiuse, completamente piene, al buio a temperatura costante. La degradazione viene seguita mediante l'analisi dell'ossigeno disciolto su un arco di tempo di 28 giorni. La quantità di ossigeno consumata dalla sostanza chimica in esame, corretta per tener conto del bianco dell'inoculo controllato in parallelo, è espressa in percentuale di ThOD o COD.

VI.2. DESCRIZIONE DEL METODO

VI.2.1. **Apparecchiatura**

a) Bottiglie per BOD, con tappi di vetro, per esempio da 250-300 ml;

b) bagno d'acqua o incubatore per mantenere le bottiglie a temperatura costante (± 1 °C o meglio) con l'esclusione di luce;

c) bottiglie di vetro grandi (2-5 l) per la preparazione dei terreni e per il riempimento delle bottiglie per BOD:

d) elettrodo a ossigeno e misuratore, o apparecchiatura e reagenti per la titolazione di Winkler.

VI.2.2. **Preparazione del mezzo minerale**

Per la preparazione della soluzione concentrata, vedi I.6.2.

Miscelare 1 ml di soluzioni da (a) a (d) e portare a 1 l con acqua di diluizione.

VI.2.3. **Preparazione dell'inoculo**

L'inoculo è normalmente proveniente da un effluente secondario di un impianto di trattamento o da una unità pilota di laboratorio alimentata prevalentemente da scarichi domestici. In alternativa una sorgente d'inoculo è un'acqua superficiale. Normalmente si usa da una goccia (0,05 ml) a 5 ml di filtrato per litro di mezzo minerale; è utile eseguire delle prove sperimentali per valutare il volume ottimale per un dato effluente (vedi I.6.4.2 e I.6.5.).

VI.2.4. **Preparazione dei contenitori**

Aerare fortemente il mezzo minerale per almeno 20 minuti. Eseguire ogni serie di esperimenti con mezzo minerale ottenuto dalla stessa partita. In generale, il mezzo è pronto per l'uso dopo essere stato a riposo per 20 ore alla temperatura di prova. Determinare la concentrazione dell'ossigeno disciolto a scopo di controllo; il valore dovrebbe essere di circa 9 mg/l a 20 °C. Eseguire tutte le operazioni di trasferimento e di riempimento del terreno saturato con aria evitando la formazione di bolle, per esempio mediante l'uso di sifoni.

▼B

Preparare gruppi paralleli di bottiglie per BOD per la determinazione delle sostanze chimiche di prova e di riferimento in serie sperimentali simultanee. Preparare un numero sufficiente di bottiglie per BOD, includendo i bianchi dell'inoculo, per permettere di fare delle misure almeno in doppio del consumo di ossigeno agli intervalli di prova desiderati, per esempio dopo 0, 7, 14, 21 e 28 giorni. Per assicurarsi di poter identificare la fase di crescita di 10 giorni (time window), possono essere necessarie un maggior numero di bottiglie.

Aggiungere mezzo minerale completamente aerato a bottiglie grandi in modo che esse siano riempite per circa un terzo. Aggiungere poi una quantità sufficiente delle soluzioni concentrate della sostanza chimica in esame e della sostanza chimica di riferimento a bottiglie grandi separate in quantità tale che la concentrazione finale delle sostanze chimiche sia normalmente non superiore a 10 mg/l. Non aggiungere sostanze chimiche al terreno di controllo del bianco contenuto in una ulteriore bottiglia grande.

Allo scopo di garantire che l'attività dell'inoculo non sia contenuta, la concentrazione dell'ossigeno disciolto non deve scendere al di sotto di 0,5 mg/l nelle bottiglie per BOD. Questo limita la concentrazione della sostanza chimica in esame a circa 2 mg/l. Tuttavia, per composti scarsamente degradabili e per quelli con un basso ThOD, si possono usare 5-10 mg/l. In alcuni casi, è consigliabile eseguire prove su serie in parallelo della sostanza chimica a due differenti concentrazioni, per esempio 2 e 5 mg/l. Normalmente, si calcola il ThOD sulla base della formazione di sali d'ammonio ma, se è prevista la nitrificazione, si calcola sulla base della formazione di nitrato ($ThOD_{NO3}$: vedi allegato II.2). Tuttavia, se si verifica una nitrificazione non completa, si effettua una correzione tenendo conto delle variazioni di concentrazione di nitrito e nitrato determinate mediante analisi (vedi allegato V).

Se si deve studiare la tossicità della sostanza chimica in esame (nel caso per esempio sia stato trovato preventivamente un basso valore di biodegradabilità), è necessaria un'altra serie di bottiglie.

Preparare un'altra bottiglia grande, che deve contenere mezzo minerale aerato (fino a circa un terzo del suo volume) più la sostanza chimica in esame e la sostanza chimica di riferimento alle concentrazioni finali normalmente uguali a quelle usate nelle altre bottiglie grandi.

Inoculare le soluzioni contenute nelle bottiglie grandi con effluente secondario (da una goccia, o circa 0,05 ml, a 5 ml/l) o con un'altra fonte, come acqua di fiume (vedi I.6.4.2.). Infine, portare a volume le soluzioni con mezzo minerale aerato utilizzando un tubo flessibile che arrivi fino al fondo della bottiglia per realizzare una adeguata miscelazione.

VI.2.5. **Numero di contenitori usati in un saggio tipo**

In una prova tipica si usano le seguenti bottiglie:

— almeno 10 contenenti la sostanza chimica in esame e l'inoculo (sospensione in esame),

— almeno 10 contenenti solo l'inoculo (bianco dell'inoculo),

— almeno 10 contenenti la sostanza chimica di riferimento e l'inoculo (controllo),

▼B

— e, quando sia necessario, 6 bottiglie contenenti la sostanza chimica in esame, la sostanza chimica di riferimento e l'inoculo (controllo di tossicità). Tuttavia, per poter essere sicuri di riuscire a identificare la fase di crescita (time window) di 10 giorni, sarà necessario un numero di bottiglie circa doppio.

VI.2.6. Esecuzione dei saggio

Dosare immediatamente ciascuna soluzione preparata nel rispettivo gruppo di bottiglie per BOD mediante un tubo flessibile prelevandola dal quarto inferiore (non dal fondo) dell'opportuna bottiglia grande in modo che tutte le bottiglie per BOD siano completamente riempite. Battere delicatamente per rimuovere eventuali bolle d'aria. Analizzare immediatamente le bottiglie al tempo zero per determinare l'ossigeno disciolto mediante il metodo di Winkler o il metodo all'elettrodo. Il contenuto delle bottiglie può venire conservato per un'analisi successiva mediante il metodo di Winkler aggiungendo solfato di manganese (II) e idrossido di sodio (il primo reagente di Winkler). Conservare le bottiglie, accuratamente tappate, contenenti l'ossigeno fissato in forma di ossido di manganese (III) idrato marrone, al buio a 10-20 ^{o}C per non oltre 24 ore prima di procedere con le fasi rimanenti del metodo di Winkler. Tappare le bottiglie in multiplo rimanenti assicurandosi che non siano intrappolate bolle d'aria, e incubare a 20 ^{o}C al buio. Ciascuna serie deve essere accompagnata da una serie parallela completa per la determinazione del bianco del mezzo inoculato. Prelevare bottiglie almeno in doppio di tutte le serie per l'analisi dell'ossigeno disciolto ad intervalli di tempo (almeno settimanali) durante i 28 giorni di incubazione.

I campioni settimanali dovrebbero permettere la valutazione della rimozione percentuale in una fase di crescita di 14 giorni, mentre un campionamento ogni 3-4 giorni dovrebbe permettere di identificare la fase di crescita di 10 giorni, il che richiederà un numero di bottiglie circa doppio.

Per sostanze in esame contenenti azoto, si devono apportare delle correzioni per il consumo dell'ossigeno che si verifica nell'eventuale nitrificazione. A questo scopo, usare il metodo dell'elettrodo a O_2 per la determinazione della concentrazione di ossigeno disciolto e prelevare poi un campione dalla bottiglia per BOD per analizzare nitriti e nitrati. Dall'aumento di concentrazione dei nitriti e dei nitrati, calcolare l'ossigeno consumato (vedi allegato V).

VI.3. DATI E RELAZIONE

VI.3.1. **Modalità di esposizione dei risultati**

Calcolare per prima cosa il BOD dopo ciascun periodo di tempo sottraendo il consumo di ossigeno (mg O_2/l) del bianco dell'inoculo da quello presentato dalla sostanza chimica in esame. Dividere questo consumo corretto per la concentrazione (mg/l) della sostanza chimica in esame per ottenere il BOD specifico come mg di ossigeno per mg di sostanza chimica in esame. Calcolare la biodegradabilità percentuale dividendo il BOD specifico per il ThOD specifico (calcolato secondo l'allegato II.2) o per il COD (determinato mediante analisi, vedi allegato II.3), come segue:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ consumato dalla sostanza chimica in esame} - \text{mg } O_2 \text{ consumato dal bianco})}{(\text{mg sostanza chimica in esame nel contenitore})}$$

▼B

= mg O_2 per mg di sostanza chimica in esame

$$\% \text{ degradazione} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg sostenza chimica)}}{\text{ThOD(mg } O_2/\text{mg sostenza chimica)}} \times 100$$

o

$$\% \text{ degradazione} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg sostenza chimica)}}{\text{COD(mg } O_2/\text{mg sostenza chimica)}} \times 100$$

Si noti che questi due metodi non forniscono necessariamente lo stesso valore; è preferibile usare il primo dei due.

Per le sostanze in esame che contengono azoto, utilizzare il valore appropriato di ThOD (NH_4 o NO_3) secondo quanto è noto o ci si aspetta per quanto riguarda il verificarsi della nitrificazione (allegato II.2). Se si verifica la nitrificazione ma non è completa, calcolare una correzione per tener conto dell'ossigeno consumato dalla nitrificazione in base alle variazioni di concentrazione dei nitriti e dei nitrati (allegato V).

VI.3.2. **Validità dei risultati**

Il consumo di ossigeno nel bianco dell'inoculo non dovrebbe superare 1,5 mg di ossigeno disciolto/l dopo 28 giorni. Valori più elevati di questo richiedono un esame delle tecniche sperimentali. La concentrazione residua di ossigeno nelle bottiglie di prova non dovrebbe scendere al di sotto di 0,5 mg/l dopo questo tempo. Livelli di ossigeno così bassi sono validi solo se il metodo usato per la determinazione dell'ossigeno disciolto è in grado di misurare accuratamente livelli così bassi.

Vedi anche I.5.2.

VI.3.3. **Relazione**

Vedi I.8.

VI.4. MODULARIO

Nel seguito è presentato un esempio di modulo predisposto.

SAGGIO DELLA BOTTIGLIA CHIUSA

1. **LABORATORIO**

2. **DATA DI INIZIO DEL SAGGIO**

3. **SOSTANZA IN ESAME**

Nome: ...

Concentrazione della soluzione stock: ... mg/l

Concentrazione iniziale nella bottiglia: ... mg/l

ThOD o COD: .. mg O_2/mg sostanza saggiata

4. **INOCULO**

Fonte: ...

Trattamento effettuato: ...

▼B

Eventuale precondizionamento: ...

Concentrazione nella miscela di reazione: ... mg/l

5. **DETERMINAZIONE DEL DO**

Metodo: Winkler/elettrodo

Analisi dei contenitori

Tempo di incubazione (d)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Bianco (senza sostanza chimica)	1	C_1				
	2	C_2				
Media	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Sostanza chimica in esame	1	a_1				
	2	a_2				
Media	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Nota: formule simili possono essere usate per i controlli della sostanza chimica di riferimento e per i controlli di tossicità.

6. **CORREZIONE PER LA NITRIFICAZIONE** (vedi allegato V)

Tempo di incubazione (d)		0	n_1	n_2	n_3
(i)	Concentrazione nitrati (mg N/l)				
(ii)	Variazione della concentrazione dei nitrati (mg N/l)	—			
(iii)	Ossigeno equivalente (mg/l)	—			
(iv)	Concentrazione nitriti (mg N/l)				
(v)	Variazione della concentrazione dei nitriti (mg N/l)	—			
(vi)	Ossigeno equivalente (mg/l)	—			
(iii + vi)	Ossigeno equivalente totale (mg/l)	—			

7. **CONSUMO DI DO: % DEGRADAZIONE**

	Abbattimento dopo n giorni (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
Recipiente 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
Recipiente 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Abbattimento dopo n giorni (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
Recipiente 1: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. of test} \times \text{ThOD chemical}}$				
Recipiente 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. of test} \times \text{ThOD chemical}}$				
$\%\ D\ \text{mean}\ (*) = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) Non prendere il valore medio se c'è una notevole differenza tra due dati replicati.

m_{to} = valore nel recipiente di saggio al tempo 0

m_{tx} = valore nel recipiente di saggio al tempo x

m_{bo} = valore medio del bianco al tempo 0

m_{bx} = valore medio del bianco al tempo x

Applicare anche la correzione per la nitrificazione da iii + vi della sezione 6.

8. **CONSUMI DI DO DEL BIANCO**

Consumo di ossigeno da parte del bianco: (m_{bo} - m_{b28}) mg/l. Questo consumo è importante per la validità del saggio. Non deve essere inferiore a 1,5 mg/l.

PARTE VII. **SAGGIO MITI** (Metodo C.4-F)

VII.1. PRINCIPIO DEL METODO

Il consumo di ossigeno da parte di una soluzione o sospensione agitata della sostanza chimica in esame in un mezzo minerale inoculato con microorganismi non adattati, coltivati in modo speciale, viene misurato in modo automatico in un arco di tempo di 28 giorni in un respirometro tenuto in ambiente chiuso al buio a 25 ± 1 °C. Il biossido di carbonio sviluppato viene assorbito mediante calce sodata. La biodegradabilità è espressa come percentuale di ossigeno consumato (corretta del consumo del bianco) rispetto all'assorbimento teorico (ThOD). La percentuale di biodegradanbilità primaria viene inoltre calcolata mediante una analisi chimica specifica supplementare effettuata all'inizio e al termine dell'incubazione e, possibilmente, mediante analisi del DOC.

VII.2. DESCRIZIONE DEL METODO

VII.2.1. **Apparecchiatura**

a) Misuratore elettrolitico automatico di BOD o respirometro equipaggiato normalmente con 6 bottiglie da 300 ml ciascuna munite di contenitori per l'assorbimento del CO_2;

▼B

b) camera e/o bagno d'acqua a temperatura costante a 25 °C ± 1 °C o meglio;

c) dispositivo di filtrazione su membrana (facoltativo);

d) analizzatore di carbonio (facoltativo).

VII.2.2. **Preparazione del mezzo minerale**

Preparare le seguenti soluzioni concentrate (stock) utilizzando reattivi puri per analisi e acqua (I.6.1.)-

(a)	Diidrogenoortofosfato monopotassico, KH_2PO_4	8,50 g
	Monoidrogenoortofosfato dipotassico, K_2HPO_4	21,75 g
	Monoidrogenoortofosfato disodico dodecaidrato $Na_2HP0_4.12\ H_2O$	44,60 g
	Cloruro d'ammonio, NH_4Cl	1,70 g
	Sciogliere in acqua e portare a 1 litro	
	Il pH della soluzione deve essere 7,2	
(b)	Solfato di magnesio eptaidrato, $MgSO_4.7\ H_2O$	22,50 g
	Sciogliere in acqua e portare a 1 litro	
(c)	Cloruro di calcio anidro, $CaCl_2$	27,50 g
	Sciogliere in acqua e portare a 1 litro	
(d)	Cloruro di ferro (III) esaidrato, $FeCl_3.6\ H_2O$	0,25 g
	Sciogliere in acqua e portare a 1 litro.	

Prelevare 3 ml di ciascuna soluzione (a), (b), (c) e (d) e portare a 1 litro.

VII.2.3. **Preparazione dell'inoculo**

Raccogliere campioni freschi provenienti da almeno 10 località, principalmente da aree nelle quali vengono usati e scaricati vari prodotti chimici. Raccogliere da località come impianti di trattamento degli scarichi di fognatura, trattamento delle acque di scarico industriali, fiumi, laghi, mari, campioni da 1 litro di fango, terreno superficiale, acqua e così via e miscelare accuratamente insieme. Dopo avere rimosso la sostanza galleggiante e aver lasciato il resto a riposo, regolare il surnatante a pH 7 ± 1 con idrossido di sodio o acido fosforico.

Utilizzare un volume appropriato del surnatante filtrato per riempire un recipiente a fango attivo del tipo riempi e preleva e aerare il liquido per circa 23 ore e mezzo. Trenta minuti dopo avere arrestato l'aerazione, scartare circa un terzo del volume totale di surnatante e aggiungere un volume uguale di una soluzione (pH = 7) contenente lo 0,1 % rispettivamente di glucosio, peptone e ortofosfato monopotassico al materiale decantato e ricominciare l'aereazione. Ripetere questa procedura una volta al giorno. L'unità del fango deve essere fatta funzionare secondo la buona pratica di laboratorio: gli effluenti dovrebbero essere limpidi, la temperatura dovrebbe mantenersi a 25 ± 2 °C, il pH dovrebbe essere 7 ± 1, il fango ben decantato, una sufficiente aereazione per mantenere la miscela aerobica per tutto il tempo, devono essere presenti protozoi e l'attività del fango deve essere verificata contro una sostanza di riferimento almeno ogni tre mesi. Non usare il fango come inoculo prima di almeno un mese di funzionamento, ma nemmeno dopo più di quattro mesi. Prelevare, quindi, campioni da almeno 10 località ad intervalli regolari, una volta ogni tre mesi.

▼B

Allo scopo di mantenere il fango fresco e quello vecchio alla stessa attività, miscelare il surnatante filtrato di un fango attivo in uso con un volume uguale del surnatante filtrato di una miscela raccolta di fresco da 10 fonti e coltivare il liquido combinato come visto sopra. Prelevare il fango da usarsi come inoculo 18-24 ore dopo che l'unità è stata alimentata.

VII.2.4. **Preparazione dei contenitori**

Preparare i seguenti sei palloni:

n. 1: sostanza chimica in esame in acqua di diluizione a 100 mg/l

n. 2, 3 e 4: sostanza chimica in esame nel mezzo minerale a 100 mg/l

n. 5: sostanza chimica di riferimento (per esempio anilina) nel mezzo minerale a 100 mg/l

n. 6: mezzo minerale da solo

Aggiungere le sostanze chimiche scarsamente solubili direttamente, in ragione del peso o del volume, o trattarle come descritto nell'allegato III, salvo il fatto che non si devono usare né solventi né agenti emulsionanti. Aggiungere l'assorbente del CO_2 in tutti i contenitori in speciali recipienti appositamente previsti. Regolare il pH nei contenitori n. 2, 3 e 4 a 7,0.

VII.2.5. **Esecuzione del saggio**

Inoculare i palloni n. 2, 3 e 4 (sospensioni in esame), n. 5 (controllo dell'attività) e n. 6 (bianco dell'inoculo) con un piccolo volume dell'inoculo fino ad una concentrazione di 30 mg/l di solidi sospesi. Non si aggiunge inoculo nel contenitore n. 1, che serve da controllo abiotico. Montare l'apparecchiatura, controllare che sia a tenuta d'aria, avviare gli agitatori e iniziare la misura dell'assorbimento di ossigeno in condizioni di buio. Controllare giornalmente la temperatura, l'agitatore e il registratore del consumo di ossigeno coulometrico e annotare tutte le eventuali variazioni di colore del contenuto dei contenitori. Leggere il consumo di ossigeno per i sei palloni mediante un idoneo metodo, per esempio direttamente dal registratore scrivente a sei punti, che produce una curva di BOD. Al termine dell'incubazione, normalmente 28 giorni, misurare il pH del contenuto nei contenitori e determinare la concentrazione della sostanza chimica in esame residua e di tutti gli eventuali intermedi e, nel caso di sostanze solubili in acqua, la concentrazione di DOC (allegato II.4). Porre una cura particolare nel caso di sostanze chimiche volatili. Se si prevede la nitrificazione, determinare, se possibile, la concentrazione di nitrati e nitriti.

VII.3. DATI E RELAZIONE

VII.3.1. **Modalità di esposizione dei risultati**

Dividere il consumo di ossigeno (mg) da parte della sostanza chimica in esame dopo un tempo stabilito (corretto del controllo del bianco di inoculo dopo lo stesso tempo) per il peso della sostanza chimica in esame usata. Questo fornisce il BOD espresso come mg di ossigeno/mg di sostanza chimica in esame, cioè

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2\text{consumato dalla sostanza chimica in esame} - \text{mg } O_2\text{consumato dal bianco})}{(\text{mg sostanza chimica in esame nel contenitore})}$$

= mg O_2 per mg di sostanza chimica in esame

▼B

La biodegradazione percentuale si ottiene poi da:

$$\%\ \text{degrad. biologica} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg sostanza chimica)}}{\text{ThOD (mg } O_2/\text{mg sostanza chimica)}} \times 100$$

Per le miscele, calcolare il ThOD dall'analisi elementare, come per i composti semplici. Utilizzare il valore appropriato di ThOD ($ThOD_{NH4}$ o $ThOD_{NO3}$) a secondo che la nitrificazione sia assente o completa (allegato II.2). Se, tuttavia, si verifica la nitrificazione ma non è completa, calcolare la correzione, che tenga conto dell'ossigeno consumato per nitrificazione, dalle variazioni di concentrazione di nitriti e nitrati (allegato V).

Calcolare la biodegradazione primaria percentuale dalla perdita del composto chimico (progenitore) specifico (vedi I.7,2.).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\%$$

Se c'è stata una perdita di sostanza chimica in esame nel contenitore n. 1 che misura la rimozione chimico-fisica, riportare questa nella relazione e usare la concentrazione della sostanza chimica in esame (S_b) dopo 28 giorni in questo pallone per calcolare la biodegradazione percentuale.

Quando si effettuano misure (facoltative) di DOC, calcolare la biodegradazione finale percentuale da:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\%$$

come descritto al punto I.7.1. Se c'è stata una perdita di DOC nel pallone n. 1, che misura la rimozione chimico-fisica, utilizzare la concentrazione di DOC in questo pallone per calcolare la biodegradazione percentuale.

Registrare tutti i risultati sui moduli allegati.

VII.3.2. **Validità dei risultati**

Il consumo di ossigeno da parte del bianco dell'inoculo è normalmente di 20-30 mg O_2/l e non dovrebbe essere maggiore di 60 mg/l in 28 giorni. Valori più elevati di 60 mg/l richiedono un esame critico dei dati e delle tecniche sperimentali. Se il valore del pH è al di fuori del campo 6-8,5 e il consumo di ossigeno da parte della sostanza chimica in esame è minore del 60 %, si dovrebbe ripetere la prova con una minore concentrazione della sostanza chimica in esame.

Vedi anche I.5.2.

Se la degradazione percentuale dell'anilina, calcolata dal consumo di ossigeno, non supera il 40 % dopo 7 giorni e il 65 % dopo 14 giorni, la prova viene considerata non valida.

VII.3.3. **Relazione**

Vedi I.8.

VII.4. MODULARIO

Nel seguito è presentato un esempio di modulo predisposto.

SAGGIO MITI (I)

1. **LABORATORIO**

2. **DATA DI INIZIO DEL SAGGIO**

▼B

3. **SOSTANZA IN ESAME**

Nome: ...

Concentrazione della soluzione stock: ... mg/l come sostanza

Concentrazione iniziale nel mezzo, C_o: ... mg/l come sostanza

Volume della miscela di reazione, V: ... ml

ThOD: ... mg O_2/l

4. **INOCULO**

Località di campionamento del fango:

1) ... 6) ...

2) ... 7) ...

3) ... 8) ...

4) ... 9) ...

5) ... 10) ...

Concentrazione dei solidi sospesi nel fango attivo dopo acclimatazione con liquido fognario sintetico = ... mg/l

Volume di fango attivo per litro di mezzo finale = ... ml

Concentrazione del fango nel mezzo finale = ... mg/l

5. **CONSUMO DI OSSIGENO: BIODEGRADABILITÀ**

Tipo di respirometro usato: ...

			Tempo (giorni)				
			0	7	14	21	28
O_2 cons. (mg) sostanza chimica in esame	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2 cons. (mg) bianco	b						
O_2 cons. (mg) corretto	$(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$						
BOD per mg di sostanza chimica in esame	$\frac{a - b}{C_o V}$	Conten. 1					
		Conten. 2					
		Conten. 3					
% degradazione $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		media (*)					

(*) Non prendere il valore medio se c'è una notevole differenza tra due dati replicati.

▼B

Nota: formule simili possono essere usate per i controlli della sostanza chimica di riferimento e per i controlli di tossicità.

6. **ANALISI DEL CARBONIO** (facoltativa)

Analizzatore di carbonio: ...

Contenitore	DOC				% DOC rimosso	Media
	Misurato		Corretto			
Acqua + sost. in esame	a				—	—
Fango + sost. in esame	b_1		b_1 - c			
Fango + sost. in esame	b_2		b_2 - C			
Fango + sost. in esame	b_3		b_3 - c			
Controllo del bianco	c		—		—	—

$$\% \text{ DOC rimosso} = \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **DATI ANALITICI DELLA SOSTANZA CHIMICA SPECIFICA**

	Quantità residua della sostanza chimica in esame al termine della prova	% degradazione
prova in bianco con acqua	S_b	
mezzo inoculato	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\%\text{degradazione} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Calcolare la degradazione % per i contenitori a_1, a_2 e a_3 rispettivamente.

8. **NOTE**

Se disponibile, allegare la curva del BOD in funzione del tempo.

▼B

ALLEGATO I

ABBREVIAZIONI E DEFINIZIONI

DO: Ossigeno disciolto (mg/1); è la concentrazione di ossigeno disciolto in un campione acquoso.

BOD: Domanda biochimica di ossigeno (g); è la quantità di ossigeno consumato dai microorganismi nella metabolizzazione di un composto in esame; espressa anche come grammi di ossigeno consumato per grammo di composto in esame (vedi metodo C.5).

COD: Domanda chimica di ossigeno (g); è la quantità di ossigeno consumata durante l'ossidazione di un composto in esame con dicromato acido caldo: fornisce una misura della quantità di materia ossidabile presente; espressa anche come grammi di ossigeno consumati per grammo di sostanza in esame (vedi metodo C.6).

DOC: Carbonio organico disciolto; è il carbonio organico presente in soluzione o che passa attraverso un filtro da 0,45 micrometri o che rimane nel surnatante dopo centrifugazione a 40 000 m/s^2 (± 4 000 g) per 15 minuti.

ThOD: Domanda teorica di ossigeno (mg); è la quantità totale di ossigeno richiesta per ossidare completamente una sostanza chimica; viene calcolata dalla formula molecolare (vedi allegato II.2) ed è espressa anche come mg di ossigeno richiesti per mg di sostanza in esame.

$ThCO_2$: Biossido di carbonio teorico (mg); è la quantità di biossido di carbonio prodotto calcolato dal contenuto di carbonio noto o misurato della sostanza in esame quando sia stata completamente mineralizzata; espresso anche come mg di biossido di carbonio sviluppati per mg di sostanza in esame.

TOC: Carbonio organico totale di un campione; è la somma del carbonio organico in soluzione e in sospensione.

IC: Carbonio inorganico.

TC: Carbonio totale; è la somma del carbonio organico e di quello inorganico presenti in un campione.

Biodegradazione primaria:

è l'alterazione della struttura chimica di una sostanza provocata da un'azione biologica, che dà come risultato la perdita delle proprietà specifiche di quella sostanza.

Biodegradazione ultima (aerobica):

è il livello di degradazione realizzato quando la sostanza in esame è completamente utilizzata da microorganismi, con il risultato della produzione di biossido di carbonio, acqua, sali minerali e nuovi costituenti cellulari microbici (biomassa).

Prontamente biodegradabile:

una classificazione arbitraria di sostanze chimiche che hanno superato certe prove specifiche di selezione riguardo alla biodegradabilità ultima; queste prove sono cosi rigorose che si suppone che tali composti si degraderanno biologicamente in modo rapido e completo in ambienti acquosi in condizioni aerobiche.

▼B

Intrinsecamente biodegradabile:

una classificazione di sostanze chimiche per le quali vi è una dimostrazione inequivocabile di biodegradazione (primaria o ultima) in qualsiasi riconosciuto saggio di biodegradabilità.

Trattabilità:

è la capacità di composti di essere rimossi durante il trattamento biologico di acque di scarico senza influire in modo dannoso sul funzionamento normale dei processi di trattamento. In generale, i composti prontamente biodegradabili possono essere trattaci, ma non tutti i composti intrinsecamente biodegradabili lo sono. Possono funzionare anche processi abiotici.

Tempo di latenza:

è il tempo che passa dall'inoculazione in un saggio di rimozione lenta a quando la degradazione percentuale è aumentata fino ad almeno il 10 %. Il tempo di latenza è spesso notevolmente variabile e scarsamente riproducibile.

Tempo di degradazione:

è il tempo che passa dal termine del tempo di latenza al momento in cui si raggiunge il 90 % o il massimo livello di degradazione.

Finestra di 10 giorni:

sono i 10 giorni che seguono immediatamente il raggiungimento del 10 % di degradazione.

▼B

ALLEGATO II

CALCOLO E DETERMINAZIONE DEI PARAMETRI SIGNIFICATIVI

Secondo il metodo scelto, saranno richiesti certi parametri somma. La sezione che segue descrive come ricavare questi valori. L'uso di questi parametri è descritto nei metodi specifici.

1. **Contenuto di carbonio**

Il contenuto di carbonio viene calcolato dalla composizione elementare nota oppure viene determinato mediante analisi elementare della sostanza in esame.

2. **Domanda teorica di ossigeno (ThOD)**

La domanda teorica di ossigeno (ThOD) può essere calcolata se è nota la composizione elementare, oppure se questa viene determinata mediante analisi elementare. Per il composto:

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

senza nitrificazione, si ha

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{PM}\ mg/mg$$

oppure, con nitrificazione,

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{PM}\ mg/mg$$

3. **Domanda chimica di ossigeno (COD)**

La domanda chimica di ossigeno (COD) viene determinata secondo il metodo C.6.

4. **Carbonio organico disciolto (DOC)**

Il carbonio organico disciolto (DOC) è per definizione il carbonio organico di qualsiasi sostanza chimica o miscela in acqua che passa attraverso un filtro da 0,45 micrometri.

Campioni estratti dal recipiente di prova vengono prelevati e filtrati immediatamente nell'apparecchiatura di filtrazione utilizzando un appropriato filtro a membrana. I primi 20 ml (quantità che può essere ridotta quando si usino filtri piccoli) del filtrato vengono scartati. Per l'analisi del carbonio si trattengono volumi di 10-20 ml, o minori, nel caso vengano iniettati (il volume dipende dalla quantità richiesta dall'analizzatore del carbonio). La concentrazione di DOC viene determinata mediante un analizzatore di carbonio organico che è in grado di misurare accuratamente una concentrazione di carbonio equivalente o minore del 10 % della concentrazione iniziale di DOC usata nella prova.

Campioni filtrati che non possono essere analizzati lo stesso giorno di lavoro possono essere conservati in frigorifero a 2-4 °C per 48 ore o al di sotto di -18 °C per periodi più lunghi.

Note:

I filtri a membrana sono spesso impregnati di tensioattivi per la idrofilizzazione. Così i filtri possono contenere fino a parecchi mg di carbonio organico solubile che interferirebbe nelle determinazioni di biodegradabilità. I tensioattivi e altri composti organici solubili vengono rimossi dai filtri bollendoli in acqua deionizzata per tre periodi di 1 ora ciascuno. I filtri possono poi venire conservati in acqua per una settimana. Se si utilizzano cartucce filtranti a perdere, ciascuna partita deve essere controllata per confermare che non liberi carbonio organico solubile.

▼B

Secondo il tipo di filtro a membrana, la sostanza chimica in esame può essere trattenuta per adsorbimento. Pertanto può essere consigliabile assicurarsi che la sostanza chimica in esame non venga trattenuta dal filtro.

Una centrifugazione a 40 000 m/s^2 (4 000 g) per 15 minuti può venire usata al posto della filtrazione per differenziare tra TOC e DOC. Il metodo non è affidabile a una concentrazione iniziale < 10 mg DOC/l perché o non vengono rimossi tutti i batteri, oppure viene ridisciolto carbonio come parte del plasma batterico.

BIBLIOGRAFIA

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th, ed. Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, Vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 — Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13 (1), 169.

▼B

ALLEGATO III

VALUTAZIONE DELLA BIODEGRADABILITÀ DI SOSTANZE SCARSAMENTE SOLUBILI

Nei saggi di biodegradabilità con sostanze scarsamente solubili, si dovrebbe prestare una particolare attenzione agli aspetti seguenti:

Mentre i liquidi omogenei raramente creano problemi di campionamento, si raccomanda di omogenizzare i materiali solidi mediante mezzi appropriati per evitare errori dovuti alla disomogenità. Un'attenzione particolare deve essere adoperata quando occorrono campioni rappresentativi di pochi mg prelevati da miscele di prodotti chimici o sostanze con grandi quantità di impurezze.

Durante le prove si possono usare varie forme di agitazione. Bisogna porre attenzione ad applicare semplicemente una agitazione sufficiente per mantenere in dispersione la sostanza chimica e ad evitare un surriscaldamento, eccessiva formazione di schiuma e eccessive forze di taglio.

Si può usare un emulsionante che fornisca una dispersione stabile della sostanza chimica. Esso non dovrebbe essere tossico per i batteri e non dovrebbe essere biodegradato né provocare schiuma nelle condizioni sperimentali.

Gli stessi criteri valgono per i solventi e gli emulsionanti.

Non è raccomandabile usare carriers solidi per le sostanze in esame solide, ma essi possono essere adatti per le sostanze oleose.

Quando si utilizzano sostanze ausiliarie, come emulsionanti, solventi e veicoli, si dovrebbe eseguire una prova in bianco contenente la sostanza ausiliaria.

Per studiare la biodegradabilità di composti scarsamente solubili si può usare uno qualunque dei tre saggi respirometrici CO_2, BOD, MITI.

BIBLIOGRAFIA

— de Morsier, A. et al. Biodegradation tests for poorly soluble compounds Chemosphere, 1987, Vol. 16, 833.

— Gerike, P. The Biodegradabily testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, 169.

▼B

ALLEGATO IV

VALUTAZIONE DELLA BIODEGRADABILITÀ DI SOSTANZE CHIMICHE DI SOSPETTA TOSSICITÀ PER L'INOCULO

Quando una sostanza chimica viene sottoposta ad un saggio di pronta biodegradabilità e risulta non biodegradabile, si raccomanda di eseguire la procedura seguente se si vuole distinguere tra inibizione e inerzia (Reynolds et al., 1987).

Si devono usare inoculi simili o identici per i saggi di tossicità e degradazione biologica.

Per valutare la tossicità di sostanze chimiche studiate in saggi di pronta biodegradabilità, sembra appropriata l'applicazione di uno dei metodi, o una loro combinazione, di inibizione del tasso di respirazione del fango (saggio di inibizione della respirazione del fango attivo — direttiva 88/302/CEE), BOD e/o inibizione della crescita.

Se si deve evitare l'inibizione dovuta a tossicità, si suggerisce di usare nelle prove di pronta biodegradabilità una concentrazione della sostanza in esame minore di 1/10 dei valori di EC_{50} (o minore dei valori di EC_{20}) ottenuti nelle prove di tossicità. I composti con un valore di Ec_{50} maggiore di 300 mg/l è improbabile che abbiano effetti tossici nelle prove di pronta biodegradabilità.

I valori di EC_{50} minori di 20 mg/l è probabile che pongano seri problemi per la successiva esecuzione delle prove. Si devono impiegare concentrazioni di prova basse, che richiedono l'uso del saggio rigoroso e sensibile della bottiglia chiusa oppure l'uso di materiale marcato ^{14}C. In alternativa, un inoculo acclimatato può permettere di usare concentrazioni più elevate della sostanza in esame. In questo ultimo caso, tuttavia, si perde lo specifico criterio di pronta biodegradabilità.

BIBLIOGRAFIA

Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 2259.

▼B

ALLEGATO V

CORREZIONE DELL'ASSORBIMENTO DI OSSIGENO PER INTERFERENZA DOVUTA A NITRIFICAZIONE

Errori dovuti al fatto di non considerare la nitrificazione, nella valutazione del consumo di ossigeno nella biodegradabilità di sostanze in esame che non contengono azoto, sono marginali (minori del 5 %), anche se si verifica, in modo irregolare, l'ossidazione dell'azoto ammoniacale nel mezzo, tra i recipienti di prova e i recipienti del bianco. Invece, per le sostanze di prova, che contengono azoto, possono verificarsi gravi errori.

Se si è avuta nitrificazione ma questa non è completa, il consumo di ossigeno osservato, nella miscela di reazione, può essere corretto tenendo conto della quantità di ossigeno utilizzata nell'ossidazione dell'ammonio a nitrito e nitrato, se si determinano le variazioni di concentrazione dei nitriti e dei nitrati durante l'incubazione, tenendo conto delle equazioni seguenti:

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Complessivamente:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Dall'equazione (1) risulta che l'ossigeno consumato da 28 g d'azoto, contenuti nel cloruro d'ammonio (NH_4Cl) ossidato a nitrito è pari a 96 g, il che corrisponde ad un fattore di 3,43 (96/28). Nello stesso modo dall'equazione (3) l'assorbimento di ossigeno da parte di 28 g di azoto, ossidati a nitrato, è di 128 g, il che corrisponde ad un fattore di 4,57 (128/28).

Poichè le reazioni avvengono *in sequenza,* in quanto sono eseguite da specie batteriche distinte e differenti, è possibile che la concentrazione di nitrito aumenti o diminuisca; in quest'ultimo caso si formerà una concentrazione equivalente di nitrato. Così, l'ossigeno consumato nella formazione di nitrato è 4,57 moltiplicato per l'aumento di concentrazione del nitrato, mentre l'ossigeno associato alla formazione di nitrito è 3,43 moltiplicato per l'aumento di concentrazione del nitrito o per la diminuzione della sua concentrazione; la perdita di ossigeno è - 3,43 moltiplicato per la diminuzione di concentrazione.

Cioè:

O_2 consumato nella formazione di nitrato = 4,57 × aumento di concentrazione dei N-nitrati (4)

e

O_2 consumato nella formazione di nitrito = 3,43 × aumento della concentrazione di N-nitrito (5)

e

O_2 perso nella sparizione dei nitriti = - 3,43 × diminuzione della concentrazione di N-nitriti (6)

Di modo chel'assorbimento di O_2 dovuto alla nitrificazione = ± 3,43 × variazione della concentrazione di N-nitrito + 4,57 × aumento della concentrazione di N-nitrato (7)

e così l'assorbimento di O_2 dovuto all'ossidazione del C = assorbimento osservato totale - assorbimento dovuto alla nitrificazione (8)

In alternativa, se si determina solo l'N totale ossidato, l'assorbimento di ossigeno dovuto alla nitrificazione può essere assunto, in prima approssimazione, pari a 4,57 × aumento di N ossidato.

Il valore corretto per il consumo di ossigeno dovuto all'ossidazione di C viene poi confrontato con il ThOD NH_4, come calcolato nell'allegato II.

▼B

C.5. DEGRADAZIONE — DOMANDA BIOCHIMICA DI OSSIGENO (BOD)

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

Il presente metodo serve a misurare la domanda biochimica di ossigeno (BOD) delle sostanze organiche solide e liquide.

I dati ottenuti con questa prova riguardano i composti idrosolubili; è tuttavia possibile, almeno in linea di principio, esaminare anche i composti volatili e quelli poco solubili in acqua.

Il metodo può essere applicato soltanto a sostanze organiche che non esercitano azione inibitoria sui batteri alla concentrazione impiegata per le prove. Se la sostanza non è solubile, per ottenere una buona dispersione potrà essere necessario ricorrere a speciali accorgimenti, come l'impiego di ultrasuoni.

Informazioni preliminari in merito alla tossicità del composto chimico possono risultare utili per interpretare i valori più bassi e per scegliere adeguate concentrazioni per la prova.

1.2. DEFINIZIONI ED UNITÀ

Si definisce BOD la quantità di ossigeno che un determinato quantitativo della sostanza in esame richiede, in determinate condizioni, per consentire il verificarsi del processo di ossidazione biochimica.

I risultati vengono espressi in g di BOD per g di sostanza esaminata.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

È consigliabile impiegare una sostanza di riferimento adatta per verificare l'attività dell'inoculo.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

Una quantità predeterminata della sostanza in esame, disciolta o dispersa in un mezzo idoneo ben aerato, viene inoculata con opportuni microorganismi e posta in incubazione al buio, a temperatura ambiente determinata e costante.

Il BOD viene determinato dalla differenza del contenuto di ossigeno disciolto all'inizio e alla fine del saggio. La durata del saggio deve essere almeno di 5 giorni e non più di 28 giorni.

Deve essere effettuata in parallelo una prova in bianco, su un sistema analogo, ma non contenente la sostanza in esame.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

La determinazione del BOD non può essere ritenuta una valida determinazione della biodegradabilità di una sostanza. Il presente metodo può essere considerato unicamente come un saggio orientativo.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO

Si prepara preliminarmente una soluzione od una dispersione della sostanza da esaminare, per ottenere una concentrazione di BOD compatibile con il metodo impiegato. Si determina successivamente il BOD seguendo un qualunque metodo nazionale o internazionale normalizzato.

▼B

2. **DATI E VALUTAZIONE**

Il BOD ottenuto nella soluzione preliminare viene calcolato conformemente al metodo normalizzato prescelto e convertito in grammi di BOD per grammo di sostanza esaminata.

3. **RELAZIONE**

Va precisato il metodo impiegato.

La domanda biochimica di ossigeno deve risultare dalla media di almeno tre misurazioni valide.

Va indicata ogni informazione ed ogni osservazione utile per l'interpretazione del saggio, soprattutto per quanto riguarda le impurezze, lo stato fisico, gli effetti tossici, la composizione intrinseca della sostanza ed ogni altro elemento tale da influenzarne i risultati.

Nella relazione va indicato l'eventuale impiego di un additivo mirante a impedire la nitrificazione biologica.

4. BIBLIOGRAFIA

Elenco di metodi normalizzati, quali ad esempio:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand

NBN 407: Biochemical oxygen demand

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV)

The determination of biochemical oxygen demand, 1981, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6. DEGRADAZIONE — DOMANDA CHIMICA DI OSSIGENO (COD)

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

Il presente metodo è destinato alla determinazione della domanda chimica di ossigeno (COD) delle sostanze organiche solide o liquide, secondo una tecnica normalizzata ed arbitraria, in condizioni di laboratorio prefissate.

Per effettuare la prova ed interpretarne i risultati sarà utile disporre di dati sulla formula chimica della sostanza (ad esempio: sali alogenati, sali ferrosi di composti organici, composti organoclorurati).

1.2. DEFINIZIONI ED UNITÀ

La richiesta chimica di ossigeno è una misura dell'ossidabilità di una sostanza, espressa come equivalente in ossigeno di un reattivo ossidante consumato dalla sostanza in condizioni di laboratorio prestabilite.

Il risultato si esprime in g COD/g sostanza in esame.

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nell'esame di nuovi prodotti non è necessario impiegare costantemente sostanze di riferimento. Queste dovrebbero servire essenzialmente a calibrare saltuariamente il metodo e fornire la possibilità di confrontare i risultati con quelli ottenuti applicando un altro metodo.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

Una quantità prestabilita della sostanza da esaminare, disciolta o dispersa in acqua, viene ossidata con potassio dicromato in ambiente fortemente acido per H_2SO_4, impiegando solfato d'argento come catalizzatore e facendo bollire a ricadere per due ore. La quantità residua di dicromato viene determinata titolando con solfato di ferro (II) e ammonio standardizzato.

Nel caso delle sostanze contenenti cloro, si aggiunge solfato di mercurio ([1]) per ridurre l'interferenza dei cloruri.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

Data l'arbitrarietà di determinazione del metodo, il COD è un «indicatore di ossidabilità» e come tale viene usato come un metodo pratico per determinare la sostanza organica.

Nella prova possono interferire i cloruri; anche riducenti o ossidanti inorganici possono interferire con la determinazione del COD.

Alcuni composti ciclici e molte sostanze volatili (per esempio acidi grassi inferiori) non vengono ossidati completamente da questo saggio.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO

Si prepara una soluzione o una dispersione della sostanza da saggiare, in modo da ottenere una domanda chimica di ossigeno compresa tra 250 e 600 mg/l di COD.

([1]) Dopo l'uso, le soluzioni contenenti sali di mercurio devono essere tranate in modo da evitare la diffusione di mercurio nell'ambiente.

▼B

Osservazioni

Nel caso di sostanze scarsamente solubili o non disperdibili, si può pesare una quantità di sostanza, finemente polverizzata od allo stato liquido, corrispondente a 5 mg di COD, e si colloca nell'apparecchio sperimentale con acqua.

La domanda chimica di ossigeno (COD) viene spesso determinata, specialmente nel caso di sostanze scarsamente solubili, secondo una variante al metodo, cioè in un sistema chiuso con un equalizzatore di pressione (H. Kelkenberg, 1975). Con questa variante, è spesso possibile riuscire a quantificare composti che si determinano solo con difficoltà con il metodo convenzionale, per esempio acido acetico. Anche questo metodo fallisce tuttavia nel caso della piridina. Se si aumenta la concentrazione del dicromato di potassio descritta nel riferimento (1), fino a 0,25 N (0,0416 M), la pesata diretta di 5-10 mg di sostanza viene facilitata, e ciò è essenziale per la determinazione del COD di sostanze scarsamente solubili in acqua (rif. 2).

Altrimenti, il COD viene poi determinato seguendo un qualunque metodo nazionale o internazionale normalizzato.

2. **DATI E VALUTAZIONI**

Il COD del recipiente sperimentale viene calcolato secondo il metodo normalizzato prescelto e trasformato in grammi di COD per grammi della sostanza in esame.

3. **RELAZIONE**

Nella relazione deve essere indicato il metodo di riferimento.

Il COD deve risultare dalla media di almeno tre misure. Devono essere riferiti tutti i dati e le osservazioni significative per l'interpretazione dei valori ottenuti: ciò vale particolarmente per le impurezze, lo stato fisico e le proprietà della sostanza (se note), qualora possano influire sui risultati.

Va altresì riferito l'eventuale impiego di solfato mercurico per minimizzare l'interferenza dei cloruri.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) Kelkenberg, H.Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compound;. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Elenco dei metodi standardizzati, ad esempio:

NBN T 91-201 Determinaition of the chemical oxygen demand.

ISBN 0 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analyis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

C.7. DEGRADAZIONE — DEGRADAZIONE ABIOTICA: IDROLISI IN FUNZIONE DEL PH

1. METODO

Il metodo di seguito descritto è equivalente alle linee guida OCSE TG 111 (2004).

1.1. INTRODUZIONE

Le sostanze chimiche possono penetrare nelle acque superficiali per immissione diretta, dispersione di sostanze nebulizzate, scorrimento, drenaggio, smaltimento dei rifiuti, tramite gli effluenti industriali, domestici o agricoli o per deposizione atmosferica, e in acqua possono subire trasformazioni mediante processi chimici (ad es. idrolisi, ossidazione), fotochimici e/o microbici. Le presenti linee guida descrivono un metodo di prova di laboratorio per valutare la trasformazione idrolitica abiotica delle sostanze chimiche nei sistemi acquatici ai valori di pH normalmente riscontrabili nell'ambiente (pH 4-9) e sono basate su linee guida già esistenti (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

Scopo degli esperimenti è determinare: i) la velocità di idrolisi della sostanza di prova in funzione del pH, e ii) l'identità o la natura e la velocità di formazione e degradazione dei prodotti dell'idrolisi ai quali gli organismi possono essere esposti. Tali esperimenti possono risultare necessari per le sostanze chimiche immesse direttamente in acqua o in grado di penetrare nell'ambiente attraverso le altre vie sopra indicate.

1.2. DEFINIZIONI E UNITÀ DI MISURA

Cfr. allegato 2.

1.3. APPLICABILITÀ DEL METODO

Il metodo è applicabile a tutte le sostanze chimiche (marcate o non marcate) per le quali sia disponibile un metodo analitico di sufficiente accuratezza e sensibilità; è applicabile a composti leggermente volatili o non volatili sufficientemente solubili in acqua, ma non a sostanze chimiche che presentano elevata volatilità in acqua (ad es. fumiganti o solventi organici) e che non possono pertanto essere mantenute in soluzione nelle condizioni sperimentali del presente saggio. L'esecuzione del saggio potrebbe risultare difficile con sostanze scarsamente solubili in acqua (8).

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

Soluzioni tampone acquose sterili con differenti valori di pH (4, 7 e 9) sono trattate con la sostanza di prova e incubate al buio in condizioni controllate di laboratorio (a temperature costanti). Ad opportuni intervalli di tempo, le soluzioni tampone sono analizzate per identificare e quantificare la sostanza di prova e i prodotti dell'idrolisi. L'uso di sostanze di prova marcate (ad es. ^{14}C) facilita la determinazione del bilancio di massa.

Questo metodo di prova è concepito secondo uno schema articolato in più fasi (o livelli), illustrato e descritto nell'allegato 1. Ogni fase è avviata sulla base dei risultati della fase precedente.

▼B

1.5. INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA DI PROVA

Per misurare la velocità di idrolisi è possibile utilizzare sostanze di prova marcate o non marcate. Generalmente per studiare il meccanismo di idrolisi e per determinare il bilancio di massa si preferisce utilizzare materiale marcato; tuttavia, in casi particolari, la marcatura può non essere affatto necessaria. Si raccomanda la marcatura con ^{14}C, ma possono risultare utili anche altri isotopi, quali ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H. Nei limiti del possibile, la marcatura va posizionata nella parte o nelle parti più stabili della molecola. Se per esempio la sostanza di prova contiene un anello, la marcatura va effettuata su questo anello; se la sostanza di prova contiene due o più anelli potrebbero essere necessari studi separati per valutare il destino di ciascun anello marcato e ottenere informazioni adeguate sulla formazione dei prodotti dell'idrolisi. La sostanza di prova deve avere una purezza minima del 95 %.

Prima di eseguire il saggio di idrolisi è necessario disporre delle seguenti informazioni sulla sostanza di prova:

a) solubilità in acqua [metodo di prova A.6];

b) solubilità in solventi organici;

c) pressione di vapore [metodo di prova A.4] e/o costante della legge di Henry;

d) coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua [metodo di prova A. 8];

e) costante di dissociazione (pK_a) [linee guida OCSE 112] (9);

f) tasso di fototrasformazione diretta o indiretta in acqua, a seconda dei casi.

Occorre disporre di metodi analitici per la quantificazione della sostanza di prova e, se necessario, per l'identificazione e la quantificazione dei prodotti dell'idrolisi in soluzioni acquose (cfr. anche punto 1.7.2).

1.6. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Ove possibile, occorre utilizzare sostanze di riferimento per l'identificazione e la quantificazione dei prodotti dell'idrolisi mediante metodi spettroscopici e cromatografici o altri metodi di sensibilità adeguata.

1.7. CRITERI DI QUALITÀ

1.7.1. **Recuperi**

L'analisi delle soluzioni tampone (almeno in duplicato) o dei loro estratti subito dopo l'aggiunta della sostanza di prova fornisce una prima indicazione della ripetibilità del metodo analitico e dell'uniformità della procedura di applicazione della sostanza. Nelle ultime fasi degli esperimenti i recuperi sono dati dai rispettivi bilanci di massa (in caso di utilizzo di sostanze marcate). Sia per le sostanze marcate che per le sostanze non marcate i recuperi devono essere compresi tra il 90 % e il 110 % (7). Qualora sia tecnicamente difficile raggiungere questo intervallo, si considera accettabile un recupero del 70 % per le sostanze non marcate, ma in tal caso occorre fornire una giustificazione.

▼B

1.7.2. **Ripetibilità e sensibilità del metodo analitico**

La ripetibilità del(i) metodo(i) analitico(i) utilizzato(i) per quantificare la sostanza di prova e i prodotti dell'idrolisi può essere verificata mediante analisi in duplicato delle stesse soluzioni tampone (o dei loro estratti) dopo la formazione di una quantità di prodotti dell'idrolisi sufficiente a permetterne la quantificazione.

Il metodo analitico deve essere sufficientemente sensibile da consentire di quantificare concentrazioni della sostanza di prova uguali o inferiori al 10 % della concentrazione iniziale. All'occorrenza i metodi analitici devono essere anche sufficientemente sensibili da consentire di quantificare qualsiasi prodotto dell'idrolisi che rappresenti almeno il 10 % della dose applicata (in qualsiasi fase del saggio) fino al 25 % o meno della sua concentrazione massima.

1.7.3. **Intervalli di confidenza dei dati cinetici dell'idrolisi**

Occorre calcolare e indicare gli intervalli di confidenza di tutti i coefficienti di regressione, delle costanti di velocità, dei tempi di dimezzamento e di tutti gli altri parametri cinetici (ad es. DT_{50}).

1.8. DESCRIZIONE DEL METODO

1.8.1. **Attrezzature e apparecchiature**

Il saggio deve essere realizzato in recipienti di vetro (ad es. provette, piccoli matracci), al buio e in condizioni sterili, se necessario, a meno che dalle informazioni preliminari (quali ad esempio il coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua) non risulti che la sostanza di prova può aderire al vetro. In tal caso, può essere necessario prendere in considerazione l'uso di materiali alternativi come il teflon. Per ovviare al problema dell'aderenza al vetro è possibile ricorrere ad uno o più dei seguenti metodi:

— determinazione della massa della sostanza di prova e dei prodotti dell'idrolisi assorbiti dal recipiente di prova;

— uso di un bagno ad ultrasuoni;

— lavaggio con solvente di tutti i recipienti in vetro in ciascun intervallo di campionamento;

— uso di prodotti formulati;

— uso di una maggiore quantità di cosolvente per aggiungere la sostanza di prova al sistema. In caso di utilizzo di un cosolvente, quest'ultimo non deve idrolizzare la sostanza di prova.

Sono normalmente necessari bagnomaria agitanti a temperatura controllata o incubatori termostatici per l'incubazione delle varie soluzioni di prova.

È necessaria la normale attrezzatura da laboratorio e in particolare:

— pH-metro;

▼B

— strumenti analitici e in particolare apparecchi per gascromatografia (GC), cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC), cromatografia su strato sottile (TLC), compresi gli opportuni sistemi di rilevazione per l'analisi delle sostanze radiomarcate e non marcate, o per il metodo della diluizione isotopica inversa;

— 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.;

— contatore a scintillazione liquida;

— imbuti separatori per estrazione liquido-liquido;

— strumenti per la concentrazione delle soluzioni e degli estratti (ad es. evaporatore rotante);

— dispositivi per il controllo della temperatura (ad es. bagnomaria).

I reagenti chimici utilizzati comprendono ad esempio:

— solventi organici di grado analitico quali l'esano, il diclorometano, ecc.;

— liquido di scintillazione;

— soluzioni tampone (per una descrizione più dettagliata cfr. punto 1.8.3).

Tutti i recipienti di vetro, l'acqua di grado reagente e le soluzioni tampone da utilizzare nei saggi di idrolisi devono essere sterilizzati.

1.8.2. **Applicazione della sostanza di prova**

La sostanza di prova deve essere applicata in soluzione acquosa nelle varie soluzioni tampone (cfr. allegato 3). Per permettere un'adeguata dissoluzione è consentito, se necessario, l'uso di piccole quantità di solventi miscibili in acqua (ad es. acetonitrile, acetone, etanolo) per l'applicazione e la distribuzione della sostanza di prova, che tuttavia non devono di norma superare l'1 % v/v. L'uso di una concentrazione più elevata di solventi (ad es. in caso di sostanze poco solubili) è ammesso solo se è possibile dimostrare che il solvente non ha alcun effetto sull'idrolisi delle sostanze di prova.

Si sconsiglia di utilizzare regolarmente prodotti formulati, in quanto non si può escludere che gli ingredienti della formulazione interferiscano con il processo di idrolisi. L'impiego di materiale formulato può tuttavia rappresentare un'alternativa adeguata nel caso di sostanze di prova scarsamente idrosolubili o caratterizzate da aderenza al vetro (cfr. punto 1.8.1).

Occorre utilizzare un'unica concentrazione della sostanza di prova, che non deve essere superiore a 0,01 M o alla metà della concentrazione di saturazione (cfr. allegato 1).

▼B

1.8.3. **Soluzioni tampone**

Il saggio di idrolisi deve essere eseguito a valori di pH 4, 7 e 9. A tal fine occorre preparare soluzioni tampone utilizzando acqua e sostanze chimiche di grado reagente. Nell'allegato 3 sono indicati alcuni utili esempi di sistemi tampone. Occorre notare che il sistema tampone utilizzato può influenzare il grado di idrolisi; in tal caso occorre utilizzare un altro sistema tampone ([1]).

Il pH di ciascuna soluzione tampone va verificato con un pH-metro tarato ad una precisione di almeno 0,1 alla temperatura richiesta.

1.8.4. **Condizioni di prova**

1.8.4.1. *Temperatura*

Gli esperimenti di idrolisi devono essere effettuati a temperature costanti. A fini di estrapolazione è importante mantenere la variazione della temperatura entro ± 0,5°C.

Se il comportamento idrolitico della sostanza di prova è sconosciuto, occorre eseguire un saggio preliminare (fase 1) ad una temperatura di 50 °C. I saggi cinetici di livello superiore devono essere eseguiti ad almeno tre temperature (compreso il saggio a 50 °C) a meno che il saggio di primo livello non abbia dimostrato la stabilità idrolitica della sostanza di prova. Si suggerisce un intervallo di temperature compreso tra 10 °C e 70 °C (preferibilmente con almeno una temperatura inferiore a 25 °C), che deve includere la temperatura di riferimento di 25 °C e la maggior parte delle temperature registrate sul campo.

1.8.4.2. *Illuminazione e ossigeno*

Tutti i saggi di idrolisi devono essere realizzati utilizzando metodi atti ad evitare effetti fotolitici. Occorre prendere tutte le misure opportune per evitare la formazione di ossigeno (ad esempio facendo gorgogliare elio, azoto o argon per 5 minuti prima di preparare la soluzione).

1.8.4.3. *Durata del saggio*

Il saggio preliminare deve essere eseguito per 5 giorni mentre i saggi di livello superiore devono essere eseguiti fino a quando non è idrolizzato il 90 % della sostanza di prova o per 30 giorni, a seconda dell'ipotesi che si verifica per prima.

1.8.5. **Esecuzione del saggio**

1.8.5.1. *Saggio preliminare (fase 1)*

Il saggio preliminare è eseguito a 50 ± 0,5°C e a valori di pH 4,0, 7,0 e 9,0. Se dopo 5 giorni l'idrolisi è inferiore al 10 % ($t0,5_{25}$ oC > 1 anno), la sostanza di prova è considerata idroliticamente stabile e non è necessario eseguire altri saggi. Se la sostanza di prova è notoriamente instabile a temperature rappresentative di quelle ambientali ([2]), non è necessario eseguire il saggio preliminare. Il metodo analitico deve essere sufficientemente preciso e sensibile da consentire di rilevare una riduzione del 10 % della concentrazione iniziale.

([1]) Mabey e Mill raccomandano l'utilizzo di tamponi borati o acetati anziché di tamponi fosfati (11).

([2]) Tali informazioni possono provenire da altre fonti: può trattarsi ad esempio di dati sull'idrolisi di composti strutturalmente affini ricavati dalla letteratura scientifica o di dati ottenuti da altri saggi preliminari semiquantitativi di idrolisi eseguiti sulla sostanza di prova ad uno stadio precedente di sviluppo.

▼B

1.8.5.2. *Idrolisi di sostanze instabili (fase 2)*

Il saggio di livello superiore (avanzato) deve essere eseguito ai valori di pH ai quali la sostanza di prova è risultata instabile nel saggio preliminare. Le soluzioni tampone della sostanza di prova devono essere termostatizzate alle temperature selezionate. Per verificare se il comportamento cinetico è di primo ordine, ogni soluzione deve essere analizzata ad intervalli di tempo che permettano di ottenere almeno sei valori adeguatamente distanziati compresi in linea di principio tra il 10 % e il 90 % di idrolisi della sostanza di prova. Occorre prelevare singole repliche dei campioni (almeno due repliche contenute in recipienti di reazione separati) e analizzare il loro contenuto in ciascuno dei sei tempi di campionamento (per un minimo di dodici valori). Il ricorso ad un unico campione globale da cui prelevare singole aliquote della soluzione di prova in ciascun intervallo di campionamento si considera inadeguato, in quanto non consente l'analisi della variabilità dei dati e può comportare problemi di contaminazione della soluzione di prova. Al termine del saggio di livello superiore (ossia al raggiungimento del 90 % di idrolisi o trascorsi 30 giorni) occorre eseguire saggi di conferma della sterilità. Tuttavia, nel caso in cui non si osservi alcuna degradazione (ossia trasformazione), tali saggi non sono considerati necessari.

1.8.5.3. *Identificazione dei prodotti dell'idrolisi (fase 3)*

Occorre identificare con appositi metodi analitici tutti i principali prodotti dell'idrolisi, ossia almeno quelli che rappresentano una percentuale uguale o superiore al 10 % della dose applicata.

1.8.5.4. *Saggi facoltativi*

Per sostanze di prova idroliticamente instabili può essere necessario eseguire ulteriori saggi a valori di pH diversi da 4, 7 e 9. Ad esempio, a fini fisiologici può essere necessario effettuare un saggio in condizioni di maggiore acidità (ad es. pH 1,2) ad un'unica temperatura rilevante dal punto di vista fisiologico (37 ^{o}C).

2. **DATI**

La quantità di sostanza di prova e, se necessario, dei prodotti dell'idrolisi, deve essere espressa in percentuale della concentrazione iniziale applicata ed eventualmente in mg/L per ciascun intervallo di campionamento e per ogni pH e temperatura di prova. Nel caso in cui sia stata utilizzata una sostanza marcata occorre inoltre indicare il bilancio di massa, espresso in percentuale della concentrazione iniziale applicata.

Occorre fornire una rappresentazione grafica dei logaritmi delle concentrazioni della sostanza di prova in funzione del tempo e identificare i principali prodotti dell'idrolisi, ossia almeno quelli che rappresentano una percentuale uguale o superiore al 10 % della dose applicata. I logaritmi delle concentrazioni di tali prodotti devono essere rappresentati graficamente nella stessa maniera della sostanza madre per evidenziare i tassi di formazione e distruzione.

▼B

2.1. TRATTAMENTO DEI RISULTATI

È possibile calcolare in modo più preciso il tempo di dimezzamento o i valori del DT_{50} utilizzando adeguati modelli cinetici. Occorre indicare il tempo di dimezzamento e/o i valori del DT_{50} (compresi i limiti di confidenza) per ciascun pH e ciascuna temperatura, insieme ad una descrizione del modello utilizzato, dell'ordine cinetico e del coefficiente di determinazione (r^2). Se necessario, i calcoli devono essere applicati anche ai prodotti dell'idrolisi.

Nel caso di studi sulla velocità di reazione effettuati a diverse temperature, le costanti di velocità di pseudo-primo ordine (k_{obs}) dell'idrolisi devono essere descritte in funzione della temperatura. Il calcolo deve basarsi sulla scomposizione di k_{obs} in costanti di velocità dell'idrolisi in catalisi acida, neutra e in catalisi basica (rispettivamente k_H, $k_{neutral}$, e k_{OH}) e sull'equazione di Arrhenius:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

dove A_i e B_i sono le costanti di regressione, rispettivamente dall'intercetta e dalla pendenza, delle rette di *best fit* ottenute dalla regressione lineare di ln k_i rispetto all'inverso della temperatura assoluta espressa in Kelvin (T). Applicando le relazioni di Arrhenius all'idrolisi catalizzata da acidi, neutra e catalizzata da basi, è possibile calcolare le costanti di velocità di pseudo-primo ordine, e di conseguenza i tempi di dimezzamento relativi ad altre temperature per le quali non è possibile una determinazione sperimentale diretta della costante di velocità (10).

2.2. VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La maggior parte delle reazioni di idrolisi segue un'apparente cinetica di primo ordine e quindi i tempi di dimezzamento sono indipendenti dalla concentrazione (cfr. equazione 4 nell'allegato 2). Ciò consente generalmente di applicare alle condizioni ambientali (concentrazioni $\leq 10^{-6}$ M) i risultati di laboratorio determinati a concentrazioni tra 10^{-2} e 10^{-3} M (10). Mabey e Mill (11) hanno indicato diversi esempi di buona corrispondenza tra la velocità di idrolisi di varie sostanze chimiche misurata in acque pure e in acque naturali, a condizione che siano stati misurati sia il pH che la temperatura.

3. **RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL SAGGIO**

3.1. RAPPORTO DI PROVA

Il rapporto di prova deve contenere almeno le seguenti informazioni:

Sostanza di prova:

— denominazione comune, nome chimico, numero CAS, formula di struttura (se si utilizza materiale radiomercato occorre indicare la posizione della marcatura) e relative proprietà fisico-chimiche (cfr. punto 1.5);

— purezza (impurità) della sostanza di prova;

— purezza radiochimica della sostanza marcata e attività molare (nei casi opportuni).

▼B

Soluzioni tampone:

— date e dettagli della preparazione;

— tamponi e acqua utilizzati;

— molarità e pH delle soluzioni tampone.

Condizioni di prova:

— date di esecuzione degli esperimenti;

— quantità di sostanza di prova applicata;

— metodo e solventi (tipo e quantità) utilizzati per l'applicazione della sostanza di prova;

— volume delle soluzioni tampone trattate con la sostanza di prova incubate;

— descrizione del sistema di incubazione utilizzato;

— pH e temperatura durante l'esperimento;

— tempi di campionamento;

— metodo(i) di estrazione;

— metodi utilizzati per la quantificazione e l'identificazione della sostanza di prova e dei prodotti della relativa idrolisi nelle soluzioni tampone;

— numero di repliche dei campioni.

Risultati:

— ripetibilità e sensibilità dei metodi di analisi utilizzati;

— recuperi (al punto 1.7.1 sono indicati i valori percentuali necessari per la validità dello studio);

— dati e medie delle repliche dei campioni, sotto forma di tabelle;

— bilancio di massa nel corso e al termine degli studi (in caso di utilizzo di sostanze di prova marcate);

— risultati del saggio preliminare;

— discussione e interpretazione dei risultati;

— tutti i dati e i valori originari.

Le seguenti informazioni sono necessarie soltanto quando si determina la velocità di idrolisi:

— rappresentazione grafica delle concentrazioni delle sostanze di prova (ed eventualmente dei prodotti dell'idrolisi) in funzione del tempo per ciascun pH e ciascuna temperatura;

— tabelle dei risultati dell'equazione di Arrhenius per una temperatura di 20 °C/25 °C, specificando il pH, la costante di velocità [h^{-1} o g^{-1}], il tempo di dimezzamento o il DT_{50}, le temperature [espresse in °C], compresi i limiti di confidenza e i coefficienti di correlazione (r^2) o altre informazioni analoghe;

— meccanismo di idrolisi proposto.

▼B

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OCSE (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adottata il 12 maggio 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(4) 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. Allegato V: destino e comportamento nell'ambiente.

(5) 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.

(6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (ottobre 1980).

(7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides (a cura di Mark R. Lynch).

(8) OCSE (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr. 23.

(9) OCSE (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Parigi. OCSE (1994 — 2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

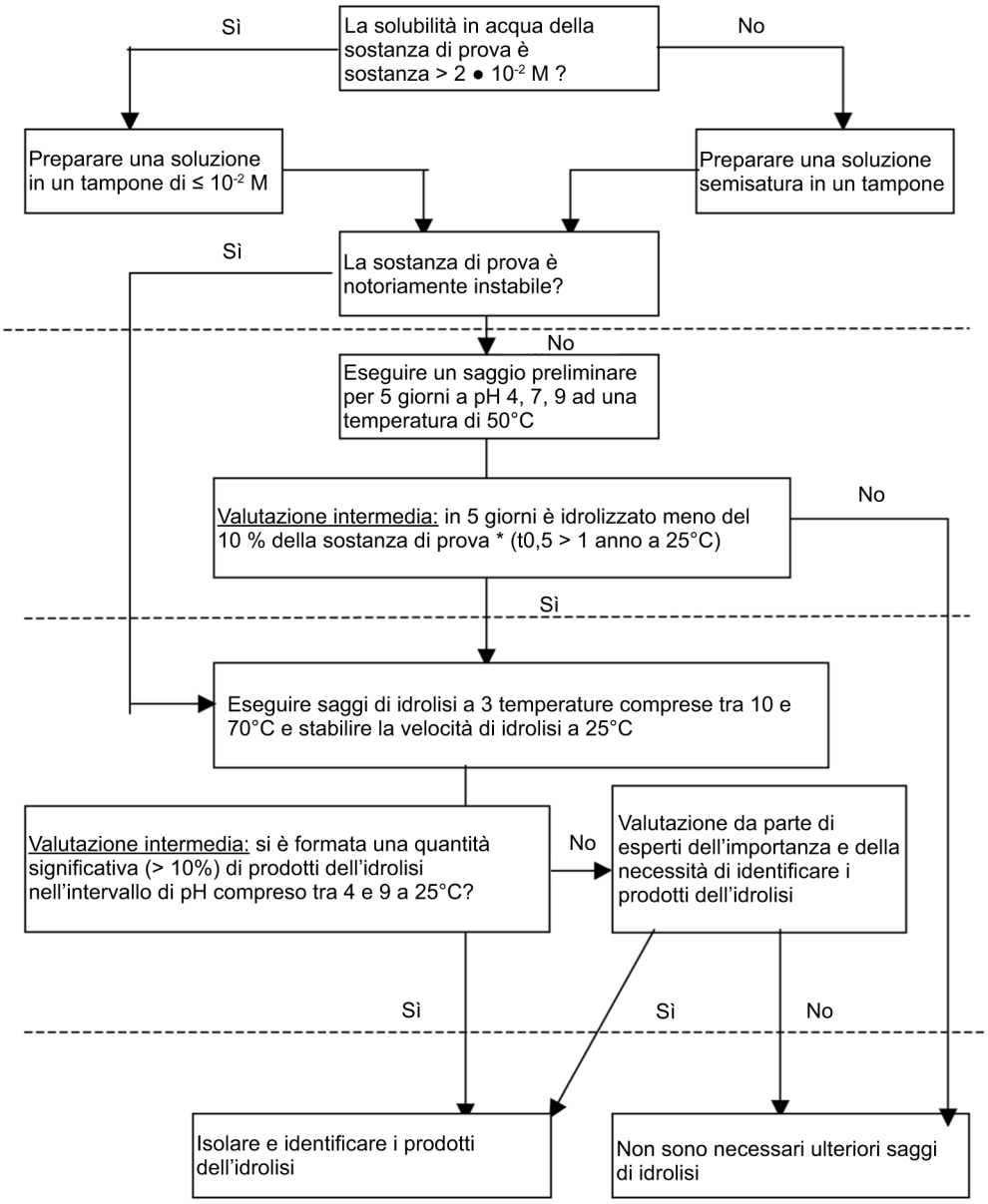
(10) Nelson, H., Laskowski D., Thermes S. e Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models (versione scritta della relazione presentata alla 14ª riunione annuale della Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas, novembre 1993).

(11) Mabey, W., Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions, J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.

▼B

ALLEGATO 1

Schema delle fasi del saggio di idrolisi



* Il 10 % di idrolisi di una sostanza di prova a 50 °C corrisponde approssimativamente ad un tempo di dimezzamento di 30 giorni, equivalente a circa 1 anno a 25°C.

▼B

ALLEGATO 2

Definizioni e unità di misura

Le unità di misura del sistema internazionale (SI) dovrebbero essere utilizzate in ogni caso.

Sostanza di prova: qualsiasi sostanza (sia il composto originale che i relativi prodotti di trasformazione).

Prodotti di trasformazione: tutte le sostanze derivanti da reazioni di trasformazione biotica o abiotica della sostanza di prova.

Prodotti dell'idrolisi: tutte le sostanze derivanti da reazioni di trasformazione idrolitica della sostanza di prova.

Idrolisi: reazione di una sostanza RX con l'acqua, con scambio netto del gruppo X con OH al centro della reazione:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

La velocità di riduzione della concentrazione di RX in questo processo semplificato è data da:

velocità = $k\ [H_2O]\ [RX]$ reazione di secondo ordine

o

velocità = $k\ [RX]$ reazione di primo ordine

a seconda dello stadio cineticamente determinante. Poiché l'acqua è presente in forte eccesso rispetto alla sostanza di prova, questo tipo di reazione è normalmente descritto come «reazione di pseudo-primo ordine», e la costante di velocità osservata è data dalla relazione

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

e può essere ricavata dall'espressione

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

dove

t = tempo

e C_o, C_t = concentrazioni di RX al tempo 0 e al tempo t.

Le unità di questa costante hanno dimensioni di $(\text{tempo})^{-1}$ e il tempo di dimezzamento (tempo necessario per ottenere una reazione del 50 % di RX) è dato da

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Tempo di dimezzamento: ($t_{0,5}$) è il tempo necessario per l'idrolisi del 50 % della sostanza di prova quando la reazione può essere descritta mediante una cinetica di primo ordine; è indipendente dalla concentrazione.

▼B

DT_{50} (Disappearance Time 50): tempo entro cui la concentrazione della sostanza di prova si riduce del 50 %; è diverso dal tempo di dimezzamento $t_{0,5}$ quando la reazione non segue una cinetica di primo ordine.

Stima di k a diverse temperature

Se sono note le costanti di velocità per due temperature, è possibile calcolare le costanti di velocità ad altre temperature utilizzando l'equazione di Arrhenius:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ o } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

La rappresentazione grafica di ln k rispetto ad 1/T è una linea retta con pendenza -E/R

in cui:

k = costante di velocità misurata a diverse temperature

E = energia di attivazione [kJ/mol]

T = temperatura assoluta [K]

R = costante universale dei gas [8,314 J/mol.K]

L'energia di attivazione è stata calcolata mediante analisi di regressione o tramite la seguente equazione:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

in cui: $T_2 > T_1$.

▼B

ALLEGATO 3

Sistemi tampone

A. **CLARK E LUBS:**

Miscele tampone di CLARK e LUBS (*)

Composizione	pH
0,2 N HCl e 0,2 N KCl a 20 °C	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl dil. a 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl dil. a 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl dil. a 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl dil. a 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl dil. a 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl dil. a 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl dil. a 100 ml	2,2
0,1 M ftalato acido di potassio + 0,1 N HCl a 20 °C	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalato acido a 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalato acido a 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalato acido a 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalato acido a 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalato acido a 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalato acido a 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalato acido a 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalato acido a 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalato acido a 100 ml	3,8
0,1 M ftalato acido di potassio + 0,1 N NaOH a 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	4,8

(*) I valori del pH riportati in queste tabelle sono stati calcolati a partire da misure del potenziale, utilizzando le equazioni standard di Sörensen (1909). I valori effettivi del pH sono superiori di 0,04 unità rispetto ai valori indicati nelle tabelle.

▼B

Composizione	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalato acido a 100 ml	6,0

Miscele tampone di CLARK e LUBS (segue)

0,1 M fosfato monopotassico + 0,1 N NaOH a 20 °C	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfato a 100 ml	8,0
0,1 M H_3B0_3 in 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH a 20 °C	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml acido borico a 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF E VLEESCHHOUWER:**

Tamponi citrato di KOLTHOFF e VLEESCHHOUWER

Composizione	pH
0,1 M citrato monopotassico e 0,1 N HCl a 18 °C (*)	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato a 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato a 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato a 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato a 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato a 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato a 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato a 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrato a 100 ml	3,6
0,1 M citrato monopotassico e 0,1 N NaOH a 18 °C (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 NNaOH + 50 ml citrato a 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrato a 100 ml	6,0

(*) Aggiungere qualche piccolo cristallo di timolo o altra sostanza simile per prevenire la formazione di muffe.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

Miscele di borati di SÖRENSEN

Composizione		Sörensen 18 °C	Walbum, pH a		
ml di borace	ml di HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M borace + 0,1 NHCl					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 M borace + 0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Miscele di fosfati di SÖRENSEN

Composizione	pH
0,0667 M fosfato monopotassico + 0,0667 M fosfato disodico a 20 °C	
99,2 ml KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

C.8. TOSSICITÀ PER I LOMBRICHI

SAGGIO SU TERRENO ARTIFICIALE

1. METODO

1.1. INTRODUZIONE

In questo saggio di laboratorio la sostanza in esame viene aggiunta ad un terreno artificiale dove si pongono i lombrichi per quattordici giorni. Dopo tale periodo (facoltativamente dopo sette giorni) si esamina l'effetto letale della sostanza sui lombrichi. Il saggio fornisce un metodo di valutazione, a termine relativamente breve, dell'effetto sui lombrichi di sostanze chimiche assunte per via cutanea e alimentare.

1.2. DEFINIZIONI E UNITÀ

LC_{50}: concentrazione di una sostanza capace di uccidere il 50 % degli animali in esame entro il periodo del saggio.

1.3. Sostanza di riferimento

Una sostanza di riferimento viene usata periodicamente per dimostrare che la sensibilità del sistema (di saggio) non è cambiata in modo significativo.

Come sostanza di riferimento si raccomanda cloroacetammide di grado analitico.

1.4. Principio del saggio

Il terreno è un elemento variabile; si usa pertanto, per questo saggio, un terreno fertile artificiale definito accuratamente. Lombrichi adulti della specie *Eisenia foetida* (vedi nota in appendice) vengono tenuti in un determinato terreno artificiale, trattato con diverse concentrazioni della sostanza in esame. Quattordici giorni (facoltativamente sette giorni) dopo l'inizio della prova, si sparge il contenuto dei recipienti su un vassoio e per ciascuna concentrazione si contano i lombrichi sopravvissuti.

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

Il saggio è programmato in modo da essere il più possibile riproducibile per quanto concerne il substrato e gli organismi in esame. Alla fine del saggio, la mortalità fra gli animali di controllo non deve superare il 10 %, altrimenti la prova non è valida.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO

1.6.1. *Materiali*

1.6.1.1. Substrato per il saggio

Come substrato di base per il saggio si usa un ben determinato terreno artificiale.

a) Substrato di base (percentuali espresse in peso secco)

— ►C1 10 % di torba di sfagno (con pH più vicino possibile a 5,5-6,0, priva di residui visibili di piante e finemente macinata) ◄;

▼B

— 20 % di argilla caolinica preferibilmente con più del 50 % di caolinite;

— circa 69 % di sabbia quarzosa industriale (sabbia a grana prevalentemente fine con oltre il 50 % dei granuli di dimensioni comprese fra 0,05 e 0,2 mm). Qualora la sostanza in esame non possa essere sufficientemente dispersa in acqua, per ogni recipiente (di saggio) andrebbero messi da parte 10 g di tale sabbia da mescolare successivamente con la sostanza stessa;

— circa 1 % di carbonato di calcio ($CaCO_3$) in polvere, chimicamente puro, aggiunto per portare il pH a 6,0 ± 0,5,

b) Substrato per il saggio

Il substrato per il saggio contiene i! substrato di base, la sostanza in esame e acqua deionizzata.

Il contenuto in acqua è circa dal 25 al 42 % del peso secco del substrato di base. Il contenuto in acqua del substrato si determina per essiccamento di un campione fino a peso costante, a 105 °C. II criterio base è che il terreno artificiale deve essere addizionato con acqua fino al punto in cui non vi sia acqua stagnante. Nel mescolare si dovrebbe fare attenzione ad ottenere una distribuzione uniforme della sostanza in esame e del substrato. Il procedimento seguito per addizionare la sostanza in esame al substrato deve essere riportato.

c) Substrato di controllo

Il substrato di controllo contiene il substrato di base e l'acqua. Se si usa un additivo, un ulteriore controllo dovrebbe contenere la stessa quantità di additivo.

1.6.1.2. Recipienti per il saggio

Recipienti di vetro della capacità di circa un litro (adeguatamente coperti con coperchi di plastica, piatti o con una pellicola di plastica muniti di fori di ventilazione) vengono riempiti, sia per il saggio che per il controllo, con una quantità di substrato umido equivalente a 500 g di peso secco di substrato.

1.6.2. *Condizioni della prova*

I recipienti dovrebbero essere tenuti in camere climatizzate a 20 °C (± 2 °C) ed illuminate in continuazione. L'intensità luminosa dovrebbe essere compressa fra 400 e 800 lux.

La durata della prova è di quattordici giorni, ma è facoltativo fare una prima determinazione della mortalità a sette giorni dall'inizio del saggio.

1.6.3. *Procedimento del saggio*

Concentrazioni del saggio

Le concentrazioni della sostanza in esame sono espresse in peso della sostanza per peso secco del substrato di base (mg/kg):

Saggio orientativo

L'intervallo delle concentrazioni che causano una mortalità variabile fra lo 0 ed il 100 % può essere determinato con un saggio orientativo che fornisca informazioni sull'intervallo di concentrazioni da impiegare nel saggio definitivo.

▼B

Si dovrebbe esaminare la sostanza alle seguenti concentrazioni: 1 000, 100, 10, 1, 0,1 mg di sostanza/kg di substrato in esame (peso secco).

Se si deve effettuare un saggio definitivo completo, per ogni prova orientativa e per il controllo non trattato, potrebbe essere sufficiente un gruppo di dieci lombrichi per ciascuna concentrazione.

Saggio definitivo

I risultati del saggio orientativo vengono impiegati per scegliere almeno 5 concentrazioni in serie geometrica, che causino una mortalità variabile fra lo 0 ed il 100 % e che differiscano fra loro per un fattore costante non superiore a 1,8.

Con questa serie di concentrazioni, il saggio dovrebbe consentire una stima la più precisa possibile del valore della LC_{50} e dei suoi limiti di confidenza.

Nella prova definitiva si usano almeno quattro gruppi di saggio per concentrazione e quattro per controlli non trattati, ciascuno con dieci lombrichi. I risultati ottenuti con questi gruppi saggiati in replicato vengono espressi con il valore medio e con la deviazione standard relativa.

Quando due concentrazioni consecutive, nel rapporto 1,8, danno una mortalità pari allo 0 ed al 100 %, questi due valori sono sufficienti ad indicare l'intervallo entro il quale è compresa la LC_{50}.

Miscela del substrato di base per il saggio e della sostanza in esame

Se possibile, il substrato per il saggio dovrebbe essere preparato senza alcun additivo che non sia acqua. Subito prima dell'inizio del saggio, si mescola con il substrato di base, oppure vi si sparge sopra uniformemente, con uno spruzzatore da cromatografia o dispositivo similare, un'emulsione o dispersione in acqua deionizzata o in altro solvente della sostanza da esaminare.

Se insolubile in acqua, la sostanza in esame può essere disciolta nel minor volume possibile di un idoneo solvente organico (per esempio esano, acetone, cloroformio).

Per solubilizzare, disperdere o emulsionare la sostanza in esame, si possono impiegare soltanto agenti che volatilizzano rapidamente. Prima dell'uso occorre ventilare il substrato per il saggio. Si deve aggiungere una quantità di acqua pari a quella evaporata. Il controllo dovrebbe contenere la stessa quantità di tutti gli additivi.

Se la sostanza in esame non è solubile, disperdibile o emulsionabile in solventi organici, 10 g di una miscela costituita da sabbia fine quarzosa e dalla quantità di sostanza in esame necessaria per trattare 500 g di peso secco di terreno artificiale, vengono mescolate con 490 g di peso secco del substrato per il saggio.

Per ciascun gruppo di saggio, si riempie ogni recipiente di vetro con una quantità di substrato umido equivalente a 500 g di peso secco, e sulla superficie del substrato si collocano 10 lombrichi precedentemente condizionati per 24 ore in un simile substrato umido e quindi lavati rapidamente ed asciugati dell'acqua in eccesso per assorbimento su carta da filtro.

▼B

I recipienti vengono coperti con coperchi, piatti o pellicole di plastica perforati per impedire l'essiccamento del substrato e sono mantenuti nelle condizioni sperimentali per quattordici giorni.

Le valutazioni andrebbero effettuate quattordici giorni (facoltativamente sette giorni) dopo l'inizio del saggio. Si sparge il substrato su un piatto di vetro o di acciaio inossidabile. Si esaminano i lombrichi e si determina il numero di quelli sopravvissuti. I lombrichi sono considerati morti se non reagiscono ad un leggero stimolo meccanico sull'estremità anteriore.

Se l'esame è effettuato dopo sette giorni, il recipiente è riempito di nuovo con lo stesso substrato ed i lombrichi sopravvissuti vengono collocati sulla sua superficie.

1.6.4. *Organismi per il saggio*

Gli organismi per il saggio dovrebbero essere individui adulti di *Eisenia foetida* (vedi la nota dell'allegato) (di almeno due mesi con clitella) del peso umido di 300-600 mg. (Per il metodo di allevamento vedi allegato).

2. **DATI**

2.1. TRATTAMENTO E VALUTAZIONE DEI RISULTATI

Si riportano le concentrazioni della sostanza esaminata con le rispettive percentuali di lombrichi morti.

Quando i dati sono affidabili si dovrebbero determinare il valore della LC_{50} e i limiti di confidenza (P = 0,05) utilizzando metodi standard (Litchfield e Wilcoxon, 1949 o un metodo equivalente). Il valore della LC_{50} dovrebbe essere espresso in mg di sostanza in esame per kg di substrato per il saggio (peso secco).

Nei casi in cui la pendenza della curva di concentrazione sia troppo elevata per consentire il calcolo della LC_{50}, è sufficiente una stima grafica di tale valore.

Quando due concentrazioni consecutive, nel rapporto di 1,8, danno mortalità pari allo 0 % ed al 100 %, questi due valori sono sufficienti per indicare l'intervallo entro il quale è situata la LC_{50}.

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— la dichiarazione che la prova è stata eseguita conformemente ai criteri di qualità sopra riportati,

— il saggio effettuato (saggio orientativo e/o saggio definitivo),

— l'esatta descrizione delle condizioni in cui è stato effettuato il saggio o la dichiarazione che il saggio è stato condotto conformemente al metodo; qualsiasi modifica del procedimento deve essere riportata,

— l'esatta descrizione del procedimento seguito per mescolare la sostanza in esame con il substrato di base,

— informazioni sugli organismi impiegati per il saggio (specie, età, media ed intervallo di variazione del peso, condizioni di mantenimento e di allevamento fornitore),

▼B

— il metodo seguito per la determinazione della LC_{50},

— i risultati del saggio comprensivi di tutti i dati utilizzati,

— la descrizione dei sintomi e dei cambiamenti osservati nel comportamento degli organismi per il saggio,

— la mortalità nei controlli,

— la LC_{50} oppure la più elevata concentrazione saggiata che non provoca mortalità e la più bassa concentrazione saggiata che provoca il 100 % di mortalità, a quattordici giorni (facoltativamente a sette giorni) dopo l'inizio della prova,

— il grafico della curva concentrazione/risposta,

— i risultati ottenuti con la sostanza di riferimento, specificando se siano stati ottenuti in associazione con il saggio in questione o da precedenti saggi di controllo di qualità.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OCSE, Parigi 1981, *Linea Guida 207,* decisione C(81) 30 def. del Consiglio.

(2) Edwards, C. A. e Lofty, 1977, *Biology of Earthworms,* Londra: Chapman and Hall, 331 pagine.

(3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de Frante, Ecologie et Systématique,* Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pagine.

(4) Litchfield, J. T. e Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.,* vol. *96,* pagine *99.*

(5) Commissione delle Comunità europee 1983, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms.* Report EUR 8714 EN.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlino 1984, Verfahrensvorschlag «Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden», in: Rudolph/Boje: Ö*kotoxikologie,* ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Appendice

Allevamento e mantenimento dei lombrichi prima del saggio

Per l'allevamento si pongono gli animali, da 30 a 50 lombrichi adulti, in una scatola di allevamento con substrato fresco e si rimuovono dopo 14 giorni. Questi animali possono essere utilizzati per ulteriori gruppi di allevamento. I lombrichi nati dalle zooteche vengono impiegati per i saggi quando sono maturi (nelle condizioni prescritte, dopo 2-3 mesi).

Condizioni di allevamento e mantenimento

Camera climatizzata:	temperatura di 20 °C (± 2 °C), di preferenza illuminata ininterrottamente (intensità da 400 a 800 lux).
Scatole di allevamento:	idonei contenitori poco profondi del volume da 10 a 20 litri.
Substrato:	*Eisenia foetida* può essere allevata in diversi escrementi animali. Come terreno per l'allevamento si raccomanda l'uso di una miscela costituita dal 50 % in volume di torba e dal 50 % di sterco di mucca o di cavallo. Il terreno dovrebbe avere un pH di circa 6-7 (corretto con carbonato di calcio) ed una bassa conduttività ionica (meno di 6 mmhos o 0,5 % di concentrazione salina). Il substrato dovrebbe essere umido ma non troppo bagnato. Oltre al metodo sopra esposto si possono impiegare con buoni risultati anche altri procedimenti.

Nota: Esistono due varietà di *Eisenia foetida* che alcuni tassonomi hanno separato in specie (Bouché, 1972). Queste sono morfologicamente simili ma una, la *Eisenia foetida foetida*, ha delle tipiche strisce o fasce trasversali sui segmenti mentre l'altra, la *Eisenia foetida andrei*, ne è priva ed ha un colore rossiccio screziato. Ove possibile si dovrebbe usare la *Eisenia foetida andrei*. Se è disponibile la metodologia necessaria, si possono usare altre specie.

▼B

C.9. **BIODEGRADAZIONE**

ZAHN-WELLENS TEST

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 3 della parte 0.

▼M4

C.10. PROVA DI SIMULAZIONE SUI SISTEMI DI TRATTAMENTO AEROBICO DEI LIQUAMI: C.10-A: UNITÀ CON FANGHI ATTIVI — C.10-B: BIOFILM

C.10-A: unità con fanghi attivi

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 303 (2001). Negli anni Cinquanta si è capito che i tensioattivi, da poco introdotti, provocavano una formazione di schiuma eccessiva negli impianti di trattamento delle acque reflue e nei fiumi. Si trattava di sostanze che non venivano completamente eliminate nel trattamento aerobico e in alcuni casi limitavano l'eliminazione di altra materia organica. Queste constatazioni hanno stimolato molte ricerche scientifiche incentrate sull'eliminazione dei tensioattivi dalle acque reflue e sulla possibilità di utilizzare nuove sostanze chimiche prodotte industrialmente per il trattamento di questo tipo di acque. Sono state utilizzate unità modello rappresentative dei due principali tipi di trattamento biologico aerobico delle acque reflue: fanghi attivi e filtri percolatori (detti anche filtri biologici). Sarebbe stato poco pratico, ed estremamente costoso, distribuire le singole nuove sostanze chimiche e monitorare i grandi impianti per il trattamento delle acque, anche solo su base locale.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

Unità con fanghi attivi

2. Sono state descritte unità modello con fanghi attivi di dimensioni variabili: da 300 ml fino a circa 2 000 ml. Alcune riproducevano da vicino il funzionamento degli impianti di scala normale, con vasche di sedimentazione dalle quali i fanghi sedimentati venivano ripompati verso il serbatoio di aerazione, mentre altre unità non prevedevano vasche di sedimentazione, cfr. Swisher (1). La dimensione dell'apparecchio rappresenta un compromesso; da un lato dev'essere sufficientemente grande da consentire un buon funzionamento meccanico e da fornire un volume adeguato di campioni senza che ciò incida sull'operatività, mentre dall'altro deve essere di dimensione sufficientemente contenuta da evitare sprechi di materiali e spazio.

3. Due tipi di apparecchiature sono stati utilizzati su larga scala e in modo soddisfacente: le unità Husmann (2) e le unità a vaso poroso (3) e (4), impiegate inizialmente per lo studio dei tensioattivi; entrambe queste apparecchiature vengono descritte nel presente metodo di prova. Anche altri apparecchi hanno dato esito soddisfacente, cfr. ad esempio Eckenfelder (5). Dato il costo e gli sforzi relativamente onerosi legati all'applicazione di questa prova di simulazione, sono state analizzate in parallelo anche altre prove di screening, più semplici e meno costose, che sono ora incluse nel capitolo C.4, lettere da A a F, del presente allegato (6). L'esperienza acquisita in merito a molti tensioattivi e ad altre sostanze chimiche ha dimostrato che quelli che superano le prove di screening (sono cioè prontamente biodegradabili) si degradano anche nella prova di simulazione. Alcuni tra quelli che non superano le prove di screening superano però le prove di biodegradabilità intrinseca [capitoli C.12 (7) e C.19 (8) del presente allegato], ma solo alcuni di questi ultimi si degradano nella prova di simulazione, mentre le sostanze chimiche che non superano le prove di biodegradabilità intrinseca non si degradano nelle prove di simulazione (9), (10), (11).

4. In alcuni casi, sono sufficienti le prove di simulazione svolte in un singolo insieme di condizioni di funzionamento specifiche. I risultati sono espressi sotto forma di eliminazione percentuale della sostanza chimica in esame o del carbonio organico disciolto (DOC). La descrizione della prova in questione è fornita nel presente metodo. Tuttavia, a differenza della precedente

▼M4

versione del presente capitolo che descriveva solo un tipo di apparecchio per il trattamento dei liquami artificiali a unità abbinate, utilizzando un metodo relativamente approssimativo per i fanghi esausti, il presente testo offre una serie di alternative, riguardo il tipo di apparecchio, la modalità di funzionamento, la rimozione dei liquami e dei fanghi esausti. Il testo segue da vicino quello della norma ISO 11733 (12), che è stato passato attentamente al setaccio in fase di preparazione, sebbene il metodo non sia stato sottoposto a prove interlaboratorio (*ring-test*).

5. In altri casi, sono necessari dati più precisi riguardo alla concentrazione della sostanza chimica in esame negli effluenti ed è quindi inevitabile ricorrere a un metodo più completo. Ad esempio, il tasso di eliminazione dei fanghi esausti va controllato con più precisione nel corso di ogni singola giornata e per tutto il periodo di prova, per cui le unità devono funzionare secondo diversi tassi di eliminazione. Un metodo veramente completo dovrebbe inoltre includere prove eseguite a due o tre temperature diverse: un metodo simile è descritto da Birch (13) (14) e riassunto nell'appendice 6. Tuttavia, le conoscenze attualmente a disposizione sono insufficienti per poter decidere quale dei modelli cinetici siano applicabili alla biodegradazione delle sostanze chimiche negli impianti per il trattamento delle acque reflue e, in generale, negli ambienti acquatici. L'applicazione della cinetica di Monod, cfr. appendice 6 a titolo d'esempio, si limita alle sostanze chimiche presenti in quantità pari a 1 mg/l e oltre, ma alcuni ritengono che anche questo sia da dimostrare. Le prove condotte su concentrazioni che meglio riflettono quelle riscontrabili nelle acque reflue sono riportate nell'appendice 7; queste prove sono state inserite in appendice, analogamente a quelle nell'appendice 6, e non pubblicate come metodi di prova a sé stanti.

Filtri

6. Si è prestata meno attenzione ai modelli pilota a filtri percolatori (detti anche letti percolatori), forse perché sono più complessi e meno compatti rispetto agli impianti pilota a fanghi attivi. Gerike *et al.* hanno sviluppato unità a filtri percolatori, facendole funzionare in modalità abbinata (15). Si tratta di filtri relativamente grandi (altezza: 2 m; volume: 60 l) che richiedono ciascuno fino a 2 l/h di liquami. Bauman *et al.* (16) hanno simulato dei filtri percolatori inserendo delle strisce di «fibra pile» di poliestere in tubi lunghi 1 m (diametro interno: 14 mm) dopo averle immerse in fanghi attivi concentrati per 30 min. La sostanza chimica in esame, quale unica fonte di carbonio in una soluzione minerale salina, è stata introdotta nel tubo verticale, valutando in seguito la biodegradazione attraverso la misurazione del DOC negli effluenti e del CO_2 nel gas emesso.

7. I biofiltri sono stati simulati seguendo una procedura diversa (15); le superfici interne di alcuni tubi rotanti, leggermente inclinati rispetto all'asse orizzontale, sono state irrorate con acque reflue (circa 250 ml/h) con e senza la sostanza chimica in esame, e gli effluenti risultanti sono stati analizzati per determinare la presenza di DOC e/o della sostanza.

PRINCIPIO DELLA PROVA

8. Il metodo intende determinare l'eliminazione e la biodegradazione primaria e/o completa di sostanze chimiche organiche idrosolubili attraverso microrganismi aerobici, in un sistema di prova a funzionamento continuo che simula il processo a fanghi attivi. Le fonti di carbonio e di energia per i microrganismi sono costituite da un mezzo organico facilmente biodegradabile e dalla sostanza chimica organica in esame.

9. Due unità di prova a funzionamento continuo (impianti a fanghi attivi o vasi porosi) vengono fatte operare in parallelo in condizioni identiche, scelte in quanto adatte ai fini della prova. Normalmente, il tempo medio di ritenzione idraulica è di 6 h e l'età media dei fanghi (tempo di ritenzione dei fanghi) varia da 6 a 10 giorni. I fanghi sono eliminati mediante uno dei metodi; la sostanza chimica in esame viene aggiunta agli affluenti (mezzo organico) di una sola delle due unità, con una concentrazione di carbonio organico disciolto (DOC) tra 10 mg/l e 20 mg/l. La seconda unità viene utilizzata come unità di controllo per determinare la biodegradazione del mezzo organico.

▼M4

10. A intervalli frequenti vengono saggiati campioni degli effluenti, nei quali vengono determinati il DOC, preferibilmente, oppure la COD (domanda chimica di ossigeno), insieme alla concentrazione della sostanza chimica in esame (se richiesto) attraverso analisi specifiche sugli effluenti provenienti dall'unità che riceve la sostanza. Quando si effettuano le misurazioni del DOC o della COD, si assume che la differenza fra le concentrazioni medie degli effluenti nelle due unità (di prova e di controllo) sia dovuta alla sostanza in esame o ai suoi metaboliti organici. Tale differenza viene confrontata con la concentrazione di DOC o COD negli affluenti dovuta all'immissione della sostanza chimica in esame, al fine di determinare l'eliminazione di quest'ultima.

11. È generalmente possibile distinguere tra biodegradazione e bioassorbimento attraverso un attento esame della curva eliminazione-tempo e la biodegradazione può normalmente essere confermata attraverso una prova di biodegradazione rapida utilizzando un inoculo acclimatato proveniente dall'unità che ha ricevuto la sostanza in esame.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA CHIMICA IN ESAME

12. È necessario disporre delle caratteristiche di purezza, idrosolubilità, volatilità e adsorbimento della sostanza in esame, in modo da permettere la corretta interpretazione dei risultati. Le sostanze chimiche volatili e insolubili non possono normalmente essere sottoposte a prova, se non dopo aver preso particolari precauzioni (cfr. appendice 5). Per calcolare i valori teorici e/o per controllare i valori dei parametri significativi, per esempio ThOD (domanda teorica di ossigeno), DOC e COD, è necessario conoscere la struttura chimica o la formula bruta.

13. Per una scelta mirata delle concentrazioni da sottoporre a prova e per interpretare correttamente dei valori di biodegradazione bassi, possono essere utili informazioni sulla tossicità della sostanza chimica in esame per i microrganismi (cfr. appendice 4).

SOGLIE MINIME

14. La biodegradabilità primaria dei tensioattivi è l'applicazione originaria della presente prova di simulazione (di conferma), e l'immissione sul mercato di un tensioattivo è subordinata all'eliminazione di più dell'80 % della sostanza specifica. Se il tasso dell'80 % non è raggiunto, si può applicare la prova di simulazione (di conferma) e il tensioattivo è immesso sul mercato solo se viene eliminato più del 90 % della sostanza chimica specifica. Per le sostanze chimiche in generale, il problema di ottenere un risultato positivo o negativo (*pass/fail*) non si pone e la percentuale di eliminazione ottenuta può servire per un calcolo approssimativo della probabile concentrazione nell'ambiente, da utilizzare nella valutazione dei rischi dovuti alle sostanze chimiche. I risultati tendono ad essere del tipo «tutto o niente». La percentuale di eliminazione del DOC ottenuta in diversi studi su sostanze chimiche pure era superiore al 90 % in oltre tre quarti dei prodotti chimici che presentavano un grado di biodegradabilità significativo e superiore all'80 % nel novanta per cento degli stessi.

15. Un numero relativamente contenuto di sostanze chimiche (ad esempio tensioattivi) è presente nei liquami alle stesse concentrazioni utilizzate nel presente metodo di prova (circa 10 mg C/l). A simili concentrazioni alcune sostanze chimiche possono essere inibitrici, mentre la cinetica di eliminazione di altre sostanze può differire a basse concentrazioni. È possibile valutare la degradazione con più precisione ricorrendo a metodi modificati e scegliendo delle concentrazioni realisticamente basse della sostanza chimica in esame; i risultati ottenuti potrebbero servire a calcolare le costanti cinetiche. Tuttavia, le tecniche sperimentali necessarie non sono state ancora completamente convalidate, né sono stati definiti i modelli cinetici che descrivono le reazioni di biodegradazione (cfr. appendice 7).

▼M4

SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

16. A volte, per assicurare il corretto svolgimento della procedura sperimentale, è utile sottoporre a prova, parallelamente alle sostanze chimiche in esame, anche delle sostanze chimiche il cui comportamento è conosciuto, ad esempio: acido adipico, 2-fenilfenolo, 1-naftolo, acido difenico, 1-acido naftoico ecc. (9) (10) (11).

RIPRODUCIBILITÀ DEI RISULTATI DELLE PROVE

17. Il numero di relazioni sulle prove di simulazione è molto inferiore rispetto a quello delle relazioni sulle prove di biodegradabilità immediata. Per le sostanze chimiche in esame degradate all'80 % od oltre la riproducibilità tra le prove condotte simultaneamente è buona (dal 10 al 15 %), ma la variabilità aumenta per le sostanze meno efficacemente degradate. Inoltre, alcune sostanze limite hanno fornito risultati molto eterogenei (ad esempio 10 %, 90 %) a diverse riprese nel corso delle nove settimane della prova.

18. I risultati ottenuti con i due tipi di apparecchi non si differenziano di molto, ma alcune sostanze chimiche hanno subito una degradazione più estesa e costante con liquami domestici invece che con liquami artificiali ricostituiti secondo la formula OCSE.

DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

Apparecchiatura

Sistema di prova

19. Il sistema di prova per una singola sostanza chimica comprende un'unità di prova e un'unità di controllo; se vengono svolte solo analisi specifiche (biodegradazione primaria) è sufficiente la sola unità di prova. Una sola unità di controllo può essere utilizzata per diverse unità di prova che ricevono le stesse o diverse sostanze chimiche sperimentali. In caso di abbinamento (appendice 3), a ciascuna unità di prova deve corrispondere un'unità di controllo. Il sistema di prova può consistere in un modello di impianto a fanghi attivi — unità di Husmann (appendice 1, figura 1) — o in un vaso poroso (appendice 1, figura 2). In entrambi i casi è necessario utilizzare serbatoi di capacità sufficiente a ricevere affluenti ed effluenti, insieme a pompe per il dosaggio degli affluenti, mischiati o non mischiati alla soluzione contenente la sostanza chimica in esame.

20. Ciascuna unità a fanghi attivi consiste in un recipiente di aerazione con una capacità nota di circa 3 litri di fanghi attivi e di un sedimentatore (chiarificatore secondario) contenente circa 1,5 litri; è possibile modificare parzialmente i volumi regolando l'altezza del sedimentatore. È consentito l'utilizzo di recipienti di dimensioni diverse, se sottoposti a carichi idraulici paragonabili. In caso non sia possibile mantenere la temperatura della sala prova nell'intervallo desiderato, si raccomanda l'uso di recipienti a camicia termostatica ad acqua. I fanghi attivi sono riciclati dal sedimentatore al recipiente di aerazione attraverso una pompa ad aria compressa o una pompa dosatrice, in continuo o a intervalli regolari.

21. Il sistema a vaso poroso consiste in un cilindro poroso a fondo conico, contenuto all'interno di un recipiente leggermente più grande, di forma identica ma in materia plastica impermeabile. Per il vaso poroso, un materiale adatto è il polietilene, spesso 2 mm e con pori di dimensione non superiore a 90 μm. La separazione dei fanghi e del mezzo organico trattato avviene mediante passaggio differenziale attraverso la parete porosa. Gli effluenti fluiscono nello spazio anulare dal quale traboccano nel recipiente di raccolta. Non avviene alcuna decantazione e di conseguenza non vi è ricircolo di fanghi. L'intero sistema può essere montato in un bagnomaria controllato

▼M4

termostaticamente. I vasi porosi si ostruiscono e rischiano di traboccare nelle fasi iniziali. Se ciò avviene, occorre sostituire il rivestimento poroso con un rivestimento pulito, cominciando per prima cosa a sifonare i fanghi dal vaso a un secchio pulito per poi rimuovere il rivestimento ostruito. Dopo aver asciugato il cilindro impermeabile esterno, occorre collocare un rivestimento pulito e rimettere i fanghi nel vaso. È anche necessario raschiare e trasferire con cura eventuali fanghi aderenti ai lati del rivestimento ostruito. La pulizia dei vasi ostruiti si effettua ricorrendo inizialmente a un leggero getto d'acqua per rimuovere i fanghi residui, in seguito mettendo a bagno i vasi prima in una soluzione diluita di ipoclorito di sodio poi in acqua, infine sciacquando accuratamente con acqua.

22. Occorre applicare tecniche appropriate all'aerazione dei fanghi nei recipienti di aerazione di entrambi i sistemi, utilizzando, ad esempio, aeratori oppure aria compressa. Se occorre, l'aria viene purificata (passando attraverso un filtro idoneo) e lavata. È necessario insufflare nel sistema una quantità d'aria sufficiente per mantenere le condizioni aerobiche e tenere perennemente in sospensione i fiocchi di fango nel corso della prova.

Apparecchio di filtrazione o centrifuga

23. I campioni vengono filtrati attraverso filtri a membrana di porosità idonea (diametro d'apertura nominale di 0,45 μm) che adsorbono le sostanze chimiche organiche solubili e rilasciano la minima quantità possibile di carbonio organico. Se i filtri utilizzati rilasciano carbonio organico, occorre lavarli accuratamente con acqua calda per rimuovere il carbonio organico lisciviato. In alternativa si può usare una centrifuga in grado di girare a 40 000 m/s^2.

Apparecchiatura di analisi

24. Apparecchiatura richiesta per determinare:

— DOC (carbonio organico disciolto) e TOC (carbonio organico totale) o COD (domanda chimica di ossigeno),

— sostanze chimiche specifiche, se richiesto,

— solidi sospesi, pH, concentrazione di ossigeno nell'acqua,

— temperatura, acidità e alcalinità,

— ammonio, nitriti e nitrati, se la prova è svolta in condizioni nitrificanti.

Acqua

25. Acqua di rubinetto, contenente meno di 3 mg/l di DOC. Determinare l'alcalinità se non già nota.

26. Acqua deionizzata, contenente meno di 2 mg/l di DOC.

Mezzo organico

27. Sono accettati, quali mezzo organico, i liquami artificiali, quelli domestici o una miscela di entrambi. È stato dimostrato (11) (14) che, spesso, l'uso di soli liquami domestici genera un maggior tasso di eliminazione del DOC e consente addirittura l'eliminazione e la biodegradazione di alcune sostanze chimiche che non sono invece biodegradate se si usano liquami artificiali ricostituiti secondo la formula OCSE. Inoltre, l'aggiunta costante o intermittente di liquami domestici spesso stabilizza i fanghi attivi e li rende capaci, crucialmente, di decantare in modo ottimale. Si raccomanda, quindi, l'uso di liquami domestici. Occorre misurare la concentrazione di DOC o COD in ciascun nuovo lotto di mezzo organico e determinarne l'acidità o alcalinità. Se il mezzo organico presenta una bassa acidità o alcalinità potrebbe essere necessario aggiungere un tampone idoneo (idrogenocarbonato di sodio o diidrogenofosfato di potassio), per mantenere un pH di circa 7,5 ± 0,5 nel recipiente di aerazione nel corso della prova. La quantità del tampone da aggiungere, e quando aggiungerla, vanno decise caso per caso. Quando le miscele vengono utilizzate in continuo o a intermittenza, occorre mantenere il DOC (o la COD) della miscela stessa a un valore pressoché costante, ad esempio diluendola con acqua.

▼M4

Liquami artificiali

28. Sciogliere per ogni litro di acqua di rubinetto i seguenti composti: 160 mg di peptone; 110 mg di estratto di carne; 30 mg di urea; 28 mg di idrogenofosfato di potassio (K_2HPO_4); 7 mg di cloruro di sodio (NaCl); 4 mg di cloruro di calcio diidrato ($CaCl_2.2H_2O$); 2 mg di solfato di magnesio eptaidrato ($MgSO_4.7H_20$); questi liquami artificiali ricostituiti secondo la formula OCSE rappresentano un esempio dove la concentrazione media di DOC negli affluenti è di circa 100 mg/l. In alternativa, utilizzare altre composizioni, con la stessa concentrazione di DOC, più prossime ai liquami reali. Se occorrono affluenti meno concentrati, diluire i liquami artificiali con acqua di rubinetto, ad esempio 1:1, per ottenere una concentrazione di circa 50 mg/l. Gli affluenti meno concentrati consentono una migliore crescita di organismi nitrificanti: occorrerà ricorrere a una concentrazione inferiore se è necessario svolgere uno studio sulla simulazione di impianti di depurazione delle acque reflue dove sia presente nitrificazione. Questi liquami artificiali, a base di acqua distillata, possono essere preparati in forma concentrata e conservati a circa 1 °C per una settimana al massimo. Se occorre, diluire con acqua di rubinetto. (Questo mezzo non è del tutto soddisfacente perché, in particolare, la concentrazione di azoto è molto elevata e il tenore di carbonio è relativamente basso, ma non è stata suggerita un'alternativa migliore, se non attraverso l'aggiunta di un tampone fosfato e di peptone).

Liquami domestici

29. Utilizzare liquami freschi decantati raccolti giornalmente in un impianto di trattamento delle acque reflue che riceve principalmente liquami domestici. Occorre prelevare i liquami prima che avvenga la sedimentazione primaria, dallo stramazzo della vasca di sedimentazione primaria oppure dall'alimentazione dell'impianto a fanghi attivi; i liquami devono essere il più possibile privi delle particelle più grosse. È possibile utilizzarli dopo averli stoccati anche per diversi giorni (in generale, però, non più di sette) a 4 °C, se è provato che il DOC (o la COD) non sono diminuiti in modo significativo (vale a dire di più del 20 %) in fase di stoccaggio. Al fine di limitare eventuali perturbazioni al sistema, occorre correggere il DOC (o la COD) di ogni nuovo lotto per ottenere un valore adeguato costante prima dell'uso, ad esempio diluendolo con acqua.

Fanghi attivi

30. Raccogliere un campione di fanghi attivi per l'inoculazione dal serbatoio di aerazione di un impianto di trattamento o da una unità pilota di laboratorio per il trattamento delle acque di scarico che tratti prevalentemente acque di origine domestica.

Soluzioni madre della sostanza in esame

31. Per le sostanze che presentano una solubilità adeguata, preparare delle soluzioni madre a concentrazioni idonee (es.: da 1 a 5 g/l) in acqua deionizzata o nella frazione minerale dei liquami artificiali (per le sostanze insolubili o volatili, cfr. appendice 5). Determinare il DOC e il carbonio organico totale (TOC) della soluzione madre e ripetere le misure per ciascun nuovo lotto. Se la differenza tra il DOC e il TOC supera il 20 %, verificare l'idrosolubilità della sostanza chimica in esame. Confrontare il DOC o la concentrazione della sostanza in esame, misurata attraverso un'analisi specifica della soluzione madre, con il valore nominale, per assicurarsi che il tasso di recupero sia sufficiente (solitamente deve superare il 90 %). Verificare, in particolare per le dispersioni, se il DOC può essere utilizzato come parametro analitico o se invece si possa applicare solo una tecnica d'analisi specifica per la sostanza in esame. Le dispersioni impongono il ricorso alla centrifuga dei campioni. Per ciascun nuovo lotto, misurare DOC, COD o la sostanza in esame attraverso un'analisi specifica.

▼M4

32. Determinare il pH della soluzione madre. I valori estremi indicano che l'aggiunta della sostanza chimica può influenzare il pH dei fanghi attivi nel sistema di prova. In tal caso, neutralizzare la soluzione madre per ottenere un pH di 7 ± 0,5 ricorrendo a piccole quantità di acido o di base inorganici, evitando però la precipitazione della sostanza in esame.

PROCEDURA

33. La procedura descritta si applica alle unità a fanghi attivi; è necessario modificarla leggermente per il sistema a vaso poroso.

Preparazione dell'inoculo

34. Per cominciare, inoculare il sistema sottoposto a prova con fanghi attivi o con un inoculo contenente una bassa concentrazione di microrganismi. Conservare l'inoculo in luogo aerato a temperatura ambiente ed utilizzarlo entro le 24 ore. Nel primo caso, raccogliere un campione di fanghi attivi dalla vasca di aerazione di un impianto di trattamento biologico delle acque reflue che funzioni efficientemente o da un'unità pilota sperimentale che riceva prevalentemente liquami domestici. Se è necessario simulare condizioni nitrificanti, raccogliere i fanghi attivi da un impianto di trattamento delle acque reflue in presenza di nitrificazione. Determinare la concentrazione di solidi in sospensione e, se necessario, concentrare i fanghi per sedimentazione in modo che il volume aggiunto al sistema sia minimo. Verificare che la concentrazione di partenza di materia secca sia intorno a 2,5 g/l.

35. Nel secondo caso, utilizzare come inoculo da 2 ml/l a 10 ml/l di effluenti provenienti da un impianto di trattamento biologico dei liquami domestici. Per ottenere il maggior numero possibile di specie o ceppi differenti di batteri può essere utile mescolare degli inoculi provenienti da varie fonti, ad esempio acque di superficie. In tal caso, i fanghi attivi si formeranno e svilupperanno nel sistema di prova.

Dosaggio del mezzo organico

36. Pulire accuratamente, all'inizio e durante la prova, tutti i recipienti destinati ad affluenti ed effluenti e i tubi che li collegano, per eliminare la proliferazione microbica. Riunire i sistemi di prova in un ambiente a temperatura controllata (normalmente tra i 20 e i 25 °C) oppure utilizzare unità di prova a camicia termostatica ad acqua. Preparare un volume sufficiente del mezzo organico richiesto (cfr. paragrafi da 27 a 29). Cominciare a riempire il recipiente di aerazione e il sedimentatore con il mezzo organico e aggiungere l'inoculo (paragrafi 34, 35). Mettere in azione il dispositivo di aerazione in modo che i fanghi siano mantenuti in sospensione e in condizioni aerobiche, cominciando a dosare gli affluenti e a riciclare i fanghi sedimentati. Dosare il mezzo organico dai recipienti di stoccaggio trasferendolo nei recipienti di aerazione (paragrafi 20, 21) delle unità di prova e di controllo e raccogliere i rispettivi effluenti in recipienti di stoccaggio simili. Per ottenere il normale tempo di ritenzione idraulica di 6 h, occorre pompare il mezzo organico a 0,5 l/h. Per confermare questa velocità di flusso, misurare la quantità quotidiana di mezzo organico dosato registrando la riduzione dei volumi del mezzo nei recipienti di stoccaggio. È necessario ricorrere ad altre modalità di dosaggio per determinare gli effetti dello scarico intermittente di una sostanza chimica oppure dell'aggiunta di «dosi shock».

37. Se il mezzo organico viene preparato in vista di un'utilizzazione la cui durata supera le 24 ore, è possibile refrigerarlo a circa 4 °C o conservarlo utilizzando un metodo adeguato, in modo da prevenire la crescita microbica e la biodegradazione al di fuori delle unità di prova (paragrafo 29). Se si utilizzano i liquami artificiali, è possibile preparare e stoccare a circa 4 °C una soluzione madre concentrata (es.: dieci volte superiore a quella normale, cfr. paragrafo 28). La soluzione madre può essere mischiata con il volume adeguato di acqua di rubinetto prima dell'uso; oppure, può essere pompata direttamente, mentre il volume adeguato di acqua di rubinetto viene pompato separatamente.

▼M4

Dosaggio della sostanza chimica in esame

38. Aggiungere un volume adeguato della soluzione madre della sostanza chimica (paragrafo 31) al recipiente di stoccaggio degli affluenti, oppure dosarla direttamente nel recipiente di aerazione, ricorrendo a un'altra pompa. La concentrazione di prova media normale negli affluenti dovrebbe situarsi tra 10 mg/l e 20 mg/l di DOC, e la concentrazione massima è di 50 mg/l. Se l'idrosolubilità della sostanza in esame è bassa, o se è possibile che si producano effetti tossici, occorre ridurre la concentrazione a 5 mg/l di DOC o addirittura meno, ma solo se è possibile applicare un metodo di analisi specifico (le sostanze di prova disperse e scarsamente solubili in acqua possono essere aggiunte attraverso tecniche di dosaggio speciali, cfr. appendice 5).

39. Quando il sistema è stabilizzato ed elimina il DOC dal mezzo organico in modo efficiente (all'80 % circa), cominciare ad aggiungere la sostanza. È importante verificare che tutte le unità operino allo stesso grado di efficienza prima di aggiungere la sostanza in esame; se così non fosse, spesso è utile mischiare i singoli fanghi e ridistribuirli in quantità uguali alle diverse unità. Se si utilizza un inoculo di circa 2,5 g/l (peso secco) di fanghi attivi, la sostanza chimica in esame può essere aggiunta sin dall'inizio della prova, in quando aggiungere direttamente e fin dall'inizio dei quantitativi crescenti presenta il vantaggio di rendere i fanghi attivi più adattabili alla sostanza in esame. A prescindere dal modo in cui viene aggiunta la sostanza in esame, si raccomanda di misurare ad intervalli regolari la velocità di flusso e/o i volumi nel o nei recipienti di stoccaggio.

Manipolazione dei fanghi attivi

40. Indipendentemente dall'inoculo utilizzato, di norma la concentrazione dei solidi nei fanghi attivi si stabilizza nel corso della prova tra 1 e 3 g/l (peso secco), a seconda della qualità e della concentrazione del mezzo organico, delle condizioni di funzionamento, della natura dei microrganismi presenti e dell'influenza della sostanza in esame.

41. Determinare i solidi in sospensione nel recipiente di aerazione almeno una volta la settimana, eliminando il surplus di fanghi per mantenere la concentrazione da 1 g/l a 3 g/l (peso secco), oppure controllare che l'età media dei fanghi si mantenga a un valore costante tra i 6 e i 10 giorni. Ad esempio, se viene scelto un tempo di ritenzione medio dei fanghi di 8 giorni, occorre rimuovere giornalmente 1/8 del volume di fanghi attivi dal recipiente di aerazione ed eliminarlo. Questa operazione va effettuata quotidianamente o, preferibilmente, attraverso una pompa automatica intermittente. Il mantenimento della concentrazione dei solidi in sospensione a un valore costante, o entro limiti ristretti, non rende però costante il tempo di ritenzione dei fanghi, e cioè la variabile che permette di determinare la concentrazione della sostanza in esame negli effluenti.

42. Per tutta la durata della prova, rimuovere, almeno una volta al giorno, eventuali fanghi che aderiscono alle pareti del recipiente di aerazione e al sedimentatore e rimetterli in sospensione. Controllare e pulire regolarmente tutti i tubi e le tubature per evitare la crescita di biofilm. Riciclare i fanghi sedimentati, rinviandoli dal sedimentatore al recipiente di aerazione, preferibilmente attraverso una pompa a intermittenza. Il sistema a vasi porosi non comporta alcun riciclo, ma occorre fare attenzione e inserire vasi interni puliti prima che il volume all'interno del recipiente raggiunga un livello troppo alto (paragrafo 21).

43. Nelle unità di Husmann si possono verificare cattiva sedimentazione e perdita di fanghi. È possibile rimediarvi effettuando in parallelo, nelle unità di prova e di controllo, una o più delle operazioni elencate di seguito:

— aggiungendo a intervalli regolari, ad esempio settimanalmente, dei fanghi freschi o un flocculante (es.: 2 ml per recipiente di una soluzione di $FeCl_3$ a 50 g/l), facendo attenzione a che il $FeCl_3$ non reagisca con la sostanza chimica in esame e non la faccia precipitare,

▼M4

— sostituendo la pompa ad aria compressa con una pompa peristaltica, al fine di creare un flusso di ricircolo dei fanghi pressappoco uguale al flusso degli affluenti in entrata da utilizzare e consentire lo sviluppo di una zona anaerobica nei fanghi sedimentati (la geometria della pompa ad aria compressa limita il flusso minimo di ritorno dei fanghi a circa dodici volte quello degli affluenti da trattare),

— pompando i fanghi in modo intermittente dal sedimentatore verso il recipiente di aerazione (es.: per 5 minuti ogni 2,5 h per riciclare da 1 l/h a 1,5 l/h),

— utilizzando un agente antischiuma atossico a concentrazione minima, che prevenga perdite dovute alla formazione di schiuma (es.: olio di silicone),

— insufflando aria nei fanghi del sedimentatore, in soffi brevi e intensi (es.: 10 secondi ogni ora),

— dosando il mezzo organico a intervalli regolari nel recipiente di aerazione (es.: dai 3 ai 10 minuti l'ora).

Campionamento e analisi

44. A intervalli regolari, misurare la concentrazione dell'ossigeno disciolto, la temperatura e il pH dei fanghi attivi nei recipienti di aerazione. Assicurarsi che sia sempre disponibile sufficiente ossigeno (> 2 mg/l) e che la temperatura si situi nell'intervallo richiesto (normalmente tra i 20 e i 25 °C). Mantenere il pH a 7,5 ± 0,5 dosando piccole quantità di una base o di un acido inorganici nel recipiente d'aerazione o negli affluenti, oppure aumentando la capacità tampone del mezzo organico (cfr. paragrafo 27). Se si verifica nitrificazione viene prodotto acido: l'ossidazione di 1 mg di azoto produce l'equivalente di circa 7 mg di CO_3^-. La frequenza delle misurazioni dipende dal parametro da misurare e dalla stabilità del sistema e può variare in funzione della cadenza giornaliera o settimanale.

45. Occorre misurare il DOC o la COD negli affluenti dei recipienti di controllo e di prova. La concentrazione della sostanza in esame negli affluenti di prova va determinata attraverso analisi specifiche od occorre stimarla a partire dalla concentrazione nella soluzione madre (paragrafo 31), dal volume utilizzato e dalla quantità di liquami dosati nell'unità di prova. Si raccomanda di calcolare la concentrazione della sostanza in esame in modo da ridurre la variabilità dei dati sulla concentrazione.

46. Prelevare dei campioni adatti dagli effluenti raccolti (es. campioni compositi sulle 24 h) e filtrarli attraverso una membrana con pori di 0,45 μm oppure centrifugarli a circa 40 000 m/s^2 per circa 15 min. Ricorrere alla centrifugazione se il filtraggio risulta difficile. Determinare il DOC o la COD almeno due volte, in modo da misurare la biodegradazione completa e, se richiesto, quella primaria, attraverso un'analisi specifica per la sostanza in esame.

47. L'utilizzo della COD può far sorgere problemi analitici a basse concentrazioni ed è raccomandato solo se la concentrazione di prova è sufficientemente alta (circa 30 mg/l). Inoltre, in caso di sostanze chimiche fortemente adsorbenti, si raccomanda di misurare la quantità di sostanza chimica adsorbita nei fanghi attraverso una tecnica di analisi specifica per la sostanza in esame.

48. La frequenza di campionamento dipende dalla durata prevista della prova. Si raccomandano tre campionamenti la settimana. Quando le unità iniziano a funzionare efficacemente, occorre lasciar trascorrere un periodo di adattamento da una a sei settimane a partire dall'introduzione della sostanza in esame, in modo da consentire il raggiungimento di uno stato stazionario. Per valutare i risultati della prova è necessario ottenere, preferibilmente, un minimo di 15 valori validi nel corso della fase di plateau (paragrafo 59), che dura normalmente tre settimane. È possibile interrompere la prova una volta raggiunto un grado di eliminazione sufficiente (es. > 90 %) e se si hanno a disposizione i 15 valori sopracitati a seguito di analisi svolte quotidianamente (giorni feriali) per tre settimane. La prova non deve generalmente estendersi al di là delle 12 settimane a partire dalla prima aggiunta della sostanza in esame.

▼M4

49. Se i fanghi subiscono un processo di nitrificazione ed occorre studiare gli effetti della sostanza in esame su tale processo, è opportuno analizzare campioni degli effluenti delle unità di prova e di controllo almeno una volta la settimana per rilevare ammonio e/o nitriti e nitrati.

50. Le analisi vanno svolte il più rapidamente possibile, in particolare quelle che riguardano l'azoto. In caso fosse necessario rimandare le analisi, conservare i campioni a circa 4 °C al buio, in bottiglie piene ed ermeticamente chiuse. Se è necessario stoccare i campioni per più di 48 h, la conservazione può avvenire tramite congelazione, acidificazione (es. 10 ml/l di un soluzione di acido solforico a 400 g/l) o aggiunta di una sostanza tossica idonea [es. 20 ml/l di una soluzione di cloruro di mercurio (II) a 10 g/l]. Assicurarsi che la tecnica di conservazione non incida sui risultati dell'analisi.

Abbinamento delle unità di prova

51. Se è necessario abbinare le unità (appendice 3), occorre scambiare quotidianamente la stessa quantità di fanghi attivi (da 150 ml a 1 500 ml per i recipienti di aerazione contenenti tre litri di liquido) tra i recipienti di aerazione dell'unità di prova e dell'unità di controllo. Se la sostanza in esame si adsorbe fortemente sui fanghi, cambiare solo il surnatante dei sedimentatori. In entrambi i casi, introdurre un fattore di correzione per calcolare i risultati della prova (paragrafo 55).

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

52. Per ogni valutazione programmata, calcolare la percentuale di eliminazione della sostanza in esame in termini di DOC o di COD ricorrendo alla seguente equazione:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

dove:

D_t = percentuale di eliminazione del DOC o della COD al tempo t

C_s = valori del DOC o della COD negli affluenti, dovuti alla sostanza chimica in esame, preferibilmente stimati a partire dalla soluzione madre (mg/l)

E = valori del DOC o della COD misurati negli effluenti di prova al tempo t (mg/l)

E_o = valori del DOC o della COD misurati negli effluenti di controllo al tempo t (mg/l)

53. Il grado di eliminazione del DOC o della COD dal mezzo organico dell'unità di controllo è utile per valutare l'attività di biodegradazione dei fanghi attivi nel corso della prova. Calcolare la percentuale di eliminazione ricorrendo alla seguente equazione:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

dove:

D_B = percentuale di eliminazione del DOC o della COD dal mezzo organico dell'unità di controllo al tempo t

C_M = DOC o COD del mezzo organico negli affluenti di controllo (mg/l)

▼M4

Calcolare, in via facoltativa, la percentuale di eliminazione del DOC o della COD generati dal mezzo organico e dalla sostanza in esame nell'unità di prova, ricorrendo alla seguente equazione:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

dove:

D_T = percentuale di eliminazione del DOC o della COD nella totalità degli affluenti di prova

C_T = DOC o COD della totalità degli affluenti di prova o calcolati a partire dalle soluzioni madri (mg/l)

54. Per ogni rilevazione calcolare l'eliminazione della sostanza in esame, se è stata misurata con un metodo di analisi specifico, ricorrendo alla seguente equazione:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

dove:

D_{ST} = percentuale di eliminazione primaria della sostanza chimica in esame al tempo t

S_i = concentrazione misurata o stimata della sostanza chimica in esame negli affluenti di prova (mg/l)

S_e = concentrazione misurata della sostanza chimica in esame negli effluenti di prova al tempo t (mg/l)

55. In modalità abbinata, compensare la diluizione della sostanza in esame nel recipiente di aerazione dovuta allo scambio di fanghi utilizzando un fattore di correzione (cfr. appendice 3). Se è stato applicato un tempo medio di ritenzione idraulica pari a 6 h ed è stata scambiata la metà del volume dei fanghi attivi contenuti nel recipiente di aerazione, occorre correggere i valori determinati dell'eliminazione quotidiana (D_t, paragrafo 52) in modo da ottenere il grado reale di eliminazione, D_{tc}, della sostanza in esame, a partire dalla seguente equazione:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Espressione dei risultati della prova

56. Tracciare su un grafico le curve dell'eliminazione D_t (o D_{tc}) e D_{st}, se disponibile, in funzione del tempo (cfr. appendice 2). È possibile trarre alcune conclusioni sul processo di eliminazione della sostanza in esame (*per se* o attraverso il DOC) a partire dall'andamento della curva.

Adsorbimento

57. Se già dall'inizio della prova si osserva una forte eliminazione della sostanza in esame in termini di DOC, la sostanza è stata probabilmente eliminata per adsorbimento sui solidi dei fanghi attivi. È possibile provare il fenomeno misurando l'adsorbimento della sostanza in esame mediante un'analisi specifica. È raro che l'eliminazione del DOC delle sostanze adsorbibili si mantenga elevata nel corso di tutta la prova; normalmente, il grado di eliminazione è elevato all'inizio per poi declinare progressivamente fino a raggiungere un valore di equilibrio. Tuttavia, se la sostanza chimica adsorbibile in esame fosse tale da causare, in un modo o nell'altro, un'acclimatazione della popolazione microbica, l'eliminazione del DOC della sostanza chimica aumenterebbe fino a raggiungere un elevato valore di plateau.

▼M4

Fase di latenza

58. Molte delle sostanze chimiche in esame, analogamente a quanto avviene nelle prove di screening statiche, attraversano una fase di latenza prima che avvenga una biodegradazione a pieno regime. Nel corso della fase di latenza, l'acclimatazione o l'adattamento dei batteri degradanti avviene senza che si produca, o quasi, l'eliminazione della sostanza in esame; in seguito, inizia la proliferazione dei batteri. Al termine di questa fase, quando circa il 10 per cento della quantità iniziale della sostanza in esame viene eliminata (compreso anche per adsorbimento, se del caso) si suppone che inizi la fase di degradazione. Il tempo di latenza è spesso notevolmente variabile e scarsamente riproducibile.

Fase di plateau

59. La fase di plateau di una curva di eliminazione in un test in continuo è definita come la fase nella quale si raggiunge il massimo livello di degradazione. La fase di plateau dovrebbe protrarsi per almeno 3 settimane ed essere determinata attraverso la misurazione di 15 valori validi.

Grado medio di eliminazione della sostanza chimica in esame

60. Calcolare il valore medio a partire dai valori di eliminazione (D_t) della sostanza in esame durante la fase di plateau. Arrotondata all'unità più vicina (1 %), tale media rappresenta il grado di eliminazione della sostanza in esame. Si raccomanda inoltre di calcolare l'intervallo di confidenza (95 %) del valore medio.

Eliminazione del mezzo organico

61. Tracciare su un grafico la percentuale di eliminazione del DOC o della COD dal mezzo organico dell'unità di controllo (D_B) in funzione del tempo. Indicare il grado medio di eliminazione come per la sostanza in esame (paragrafo 60).

Indicazione della biodegradazione

62. Se la sostanza in esame non viene adsorbita in modo significativo sui fanghi attivi e se la curva di eliminazione presenta il profilo tipico di una curva di biodegradazione con fasi di latenza, degradazione e plateau (cfr. paragrafi 58 e 59), l'eliminazione misurata può essere attribuita con certezza alla biodegradazione. Se il livello di eliminazione è alto in fase iniziale, la prova di simulazione non consente di distinguere tra i processi di eliminazione biologici e non biologici. In questi casi, come nei casi in cui la biodegradazione suscita dubbi (ad esempio, quando si osserva un fenomeno di stripping), occorre analizzare le sostanze in esame adsorbite oppure effettuare prove di biodegradazione statiche supplementari basate su parametri che indicano chiaramente i processi biologici. Si tratta di prove che si basano sul consumo di ossigeno [capitolo C.4, lettere D, E e F del presente allegato (6)] o sulla misurazione della produzione di diossido di carbonio [capitolo C.4-C del presente allegato (6)] oppure sul metodo ISO per la prova del CO_2 nello spazio di testa (18) che utilizza un inoculo pre-esposto proveniente dal test di simulazione. Se sono state misurate sia l'eliminazione del DOC sia l'eliminazione della sostanza chimica specifica, la presenza di differenze significative (essendo la prima inferiore alla seconda) tra le percentuali indica che gli effluenti contengono dei prodotti organici intermedi probabilmente più difficili da degradare rispetto al composto progenitore.

Validità dei risultati della prova

63. L'ottenimento di informazioni sulla normale attività di biodegradazione dell'inoculo è subordinata alla determinazione del grado di eliminazione del mezzo organico (paragrafo 53) nell'unità di controllo. Il test è da considerare valido se il grado di eliminazione del DOC e della COD nella o nelle unità di controllo è superiore all'80 % dopo due settimane e se non si osserva alcun fenomeno insolito.

▼M4

64. Se è stata utilizzata una sostanza chimica di riferimento prontamente biodegradabile, il grado di biodegradazione (Dt, paragrafo 52) deve essere superiore al 90 %.

65. Se la prova viene svolta in condizioni nitrificanti, la concentrazione media negli effluenti deve essere < 1 mg/l di azoto ammoniacale e < 2 mg/l di azoto sotto forma di nitriti.

66. Se non vengono soddisfatti questi criteri, ripetere la prova utilizzando un inoculo proveniente da una fonte diversa, sottoporre a prova una sostanza di riferimento e riesaminare tutte le procedure sperimentali.

Relazione sulla prova

67. La relazione deve includere le seguenti informazioni:

Sostanza chimica in esame:

— dati identificativi,

— natura fisica e proprietà fisico-chimiche.

Condizioni sperimentali:

— descrizione del sistema di prova utilizzato; qualsiasi modifica introdotta nella prova per testare le sostanze chimiche insolubili o volatili,

— tipo di mezzo organico,

— proporzione e natura degli effluenti industriali presenti nelle acque di scarico, se note,

— inoculo: natura e località del campionamento, concentrazione ed eventuale pretrattamento,

— soluzioni madre della sostanza chimica in esame: tenore di DOC e di TOC; modalità di preparazione, se si tratta di una sospensione; concentrazione utilizzata per la prova; giustificare, eventualmente, valori che si discostano dall'intervallo 10-20 mg/l di DOC; modalità di aggiunta; data della prima aggiunta; eventuali modifiche,

— età media dei fanghi attivi e tempo medio di ritenzione idraulica; metodo di rimozione dei fanghi attivi esausti; metodi per affrontare il rigonfiamento (bulking), la perdita di fanghi attivi ecc.,

— tecniche di analisi utilizzate,

— temperatura di prova,

— qualità del rigonfiamento dei fanghi; indice di volume dei fanghi (SVI, *sludge volume index*); solidi sospesi nella miscela liquida (MLSS, *mixed liquor suspended solids*),

— ogni eventuale scarto dalla normale modalità operativa e ogni eventuale circostanza suscettibile di aver inciso sui risultati.

Risultati della prova:

— tutti i dati derivanti dalle misurazioni (DOC, COD, analisi specifiche, pH, temperatura, concentrazione di ossigeno, solidi sospesi, sostanze azotate, se del caso),

— tutti i valori calcolati per D_t (o D_{tc}) D_B e D_{St}, presentati sotto forma di tabella e di curve di eliminazione,

— informazioni sulle fasi di latenza e di plateau, la durata della prova, il grado di eliminazione della sostanza in esame e del mezzo organico nell'unità di controllo, insieme alle informazioni statistiche e conclusioni sulla biodegradabilità e sulla validità della prova,

— discussione dei risultati.

▼**M4**

BIBLIOGRAFIA

(1) Swisher RD (1987). «Surfactant Biodegradation», 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.

(2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698-706.

(3) Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

(4) Painter HA and King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909-915.

(5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

(6) Capitolo C.4 del presente allegato, Determinazione della «pronta» (*ready*) biodegradabilità.

(7) Capitolo C.12 del presente allegato, Biodegradazione — saggio SCAS modificato.

(8) Capitolo C.19 del presente allegato, Stima del coefficiente di adsorbimento (K_{OC}) sul terreno e sui fanghi di acque da scarico mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).

(9) Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157-173.

(10) Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.

(11) Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(12) ISO 11733 (1995; revised 2004). Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium - activated sludge simulation test.

(13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33-48.

(14) Birch RR (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.

(15) Gerike P, Fischer WK and Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753-758.

(16) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(17) Her Majesty's Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pagg. 91-98 ISBN 011 751661 9.

(18) ISO 14593 (1998). Water Quality — Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.

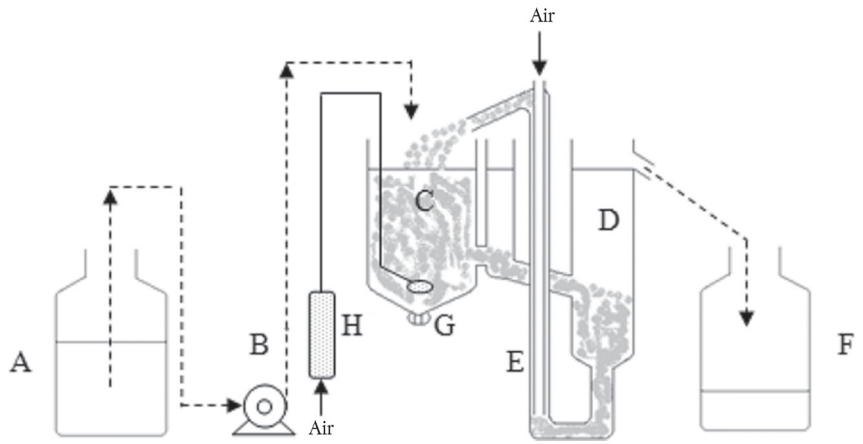
▼**M4**

Appendice 1

Figura 1

Attrezzatura per valutare la biodegradabilità

Unità di Husmann



A. recipiente di stoccaggio

B. pompa dosatrice

C. recipiente di aerazione (capacità 3 litri)

D. decantatore

E. pompa ad aria compressa

F. recipiente di raccolta

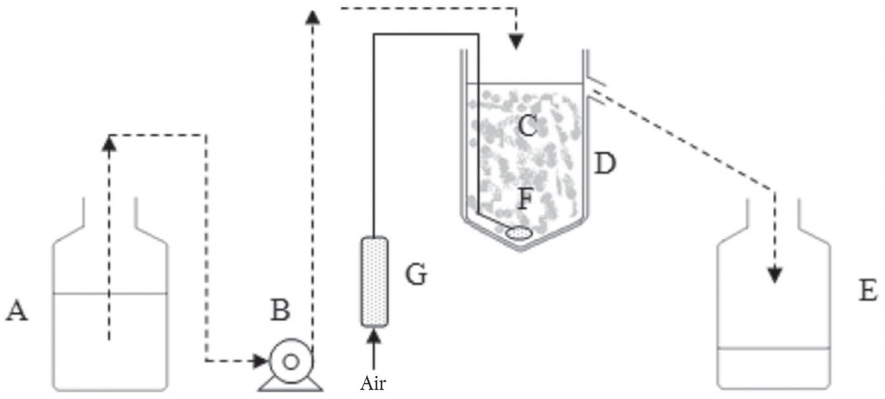
G. aeratore

H. flussimetro

Figura 2

Attrezzatura per valutare la biodegradabilità

Vaso poroso



A. recipiente di stoccaggio

B. pompa dosatrice

C. recipiente poroso di aerazione

D. recipiente esterno impermeabile

E. recipiente di raccolta

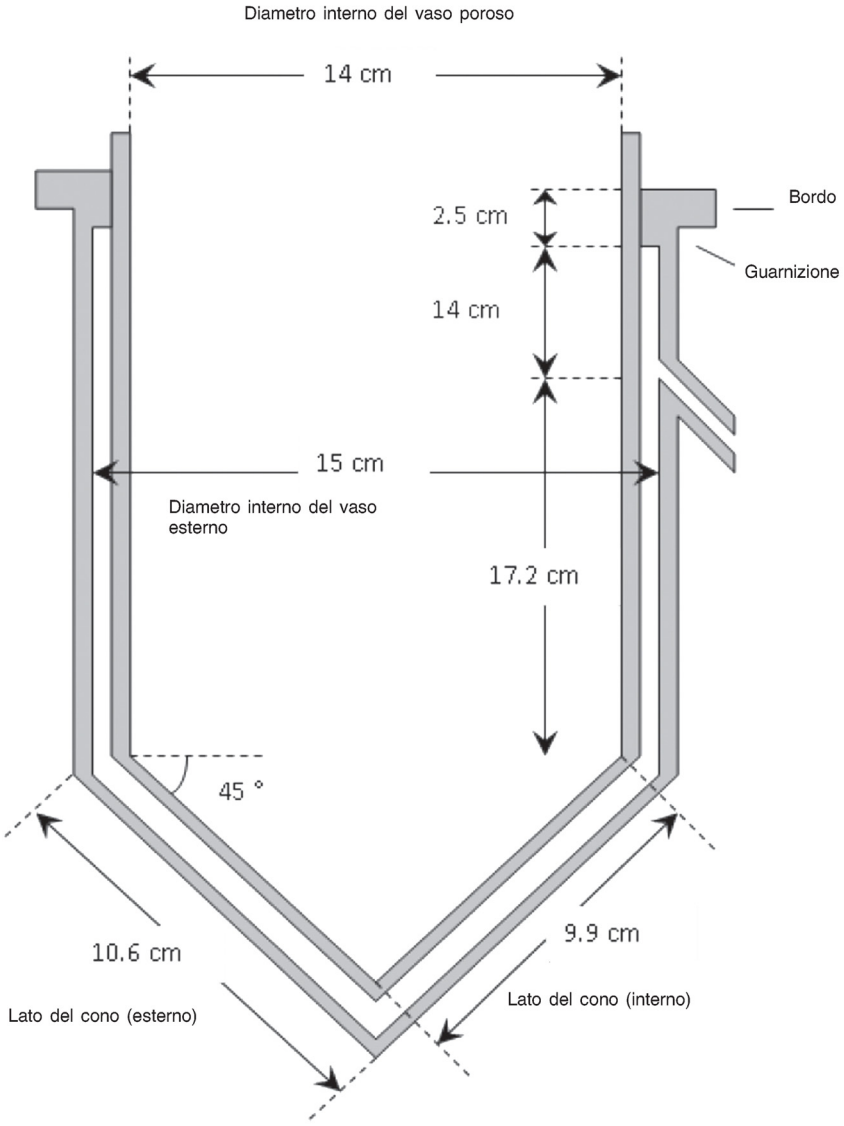
F. diffusore

G. flussimetro

▼M4

Figura 3

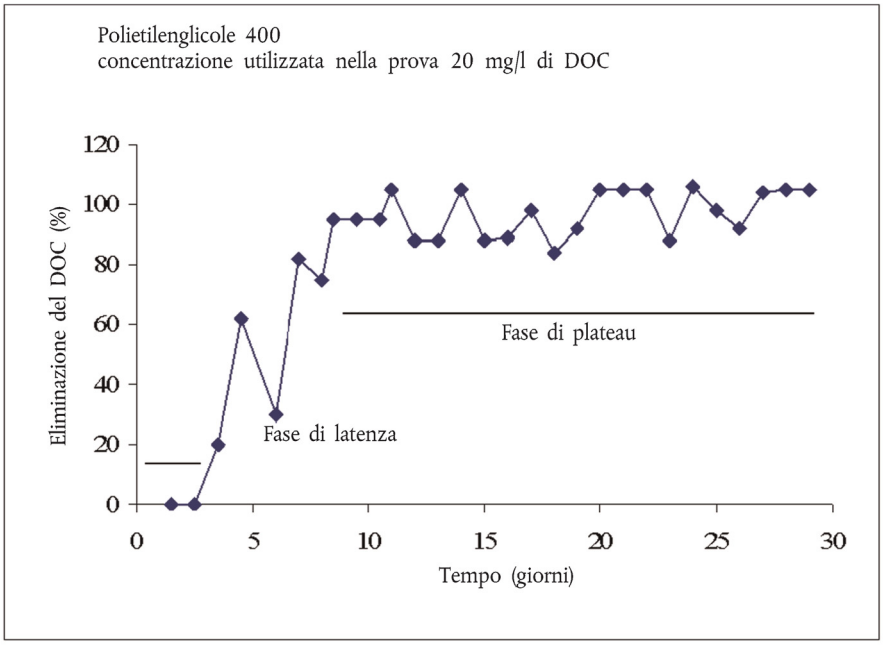
Dettagli del recipiente di aerazione a vaso poroso da 3 litri



▼**M4**

Appendice 2

Esempio di curva di eliminazione



▼M4

Appendice 3

[INFORMAZIONI SUPPLEMENTARI]

ABBINAMENTO DELLE UNITÀ DI PROVA

Nel tentativo di livellare le popolazioni microbiche nei fanghi attivi dell'unità di prova (dove confluiscono i liquami più la sostanza in esame) e dell'unità di controllo (dove confluiscono solo i liquami) è stato introdotto uno scambio giornaliero di fanghi tra le due unità (1). La procedura, detta «abbinamento», ha dato origine al «processo ad unità abbinate». L'abbinamento, inizialmente realizzato su unità di Husmann a fanghi attivi, è stato applicato anche a unità a vasi porosi (2) (3). I risultati ottenuti con unità abbinate e con unità non abbinate, sia nel caso di unità di Husmann sia in quello di unità a vasi porosi, non presentano differenze significative e non c'è quindi alcun vantaggio ad investire tempo ed energia nell'abbinamento.

Lo scambio dei fanghi può far credere che avvenga un'eliminazione piuttosto importante, dato che una parte della sostanza chimica in esame viene trasferita e che lo scarto tra la concentrazione di tale sostanza negli effluenti di prova e negli effluenti di controllo diviene pressoché nullo. È quindi necessario applicare dei fattori di correzione che dipendono dalla frazione oggetto dello scambio e dal tempo medio di ritenzione idraulica. È stato pubblicato un metodo di calcolo più dettagliato (1).

Calcolare il grado d'eliminazione corretto del DOC o della COD utilizzando la formula generale:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

dove:

D_{tc} = percentuale di eliminazione, corretta, del DOC o della COD

D_t = percentuale di eliminazione, determinata, del DOC o della COD

a = frazione volumetrica scambiata tra le unità a fanghi attivi

r = tempo medio di ritenzione idraulica (h)

Se, per esempio, viene scambiata la metà del volume del recipiente di aerazione (a = 0,5) e il tempo medio di ritenzione idraulica è di 6 h, la formula di correzione diventa:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

BIBLIOGRAFIA

(1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.

(2) Painter HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pagg. 113-138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

Appendice 4

VALUTAZIONE DELL'INIBIZIONE DEI FANGHI ATTIVI

Processo a mezzo delle sostanze chimiche in esame

1. Può succedere che una sostanza chimica (o dei liquami) non vengano né degradati né eliminati nella prova di simulazione e che possano addirittura avere un effetto inibitorio sui microrganismi dei fanghi. Alcune sostanze chimiche vengono biodegradate a basse concentrazioni ma svolgono un'azione inibitoria a concentrazioni superiori (ormesi). Gli effetti inibitori possono essere rivelati a uno stadio precedente oppure essere determinati attraverso una prova di tossicità, utilizzando un inoculo simile o identico a quello usato nella prova di simulazione (1). Si tratta di metodi di prova inibitori del consumo di ossigeno [capitolo C.11 del presente allegato (2) e norma ISO 8192 (3)] oppure inibitori della crescita degli organismi dei fanghi attivi [norma ISO 15522 (4)]

2. L'inibizione che avviene nel corso della prova di simulazione si manifesta attraverso la differenza del DOC e della COD degli effluenti del recipiente di prova e di quelli del recipiente di controllo, che è superiore al DOC aggiunto attraverso la sostanza chimica in esame. Altrimenti espresso, la presenza della sostanza chimica in esame riduce la percentuale di eliminazione della COD (nonché del BOD e della COD, e/o di NH^{+}_{4}) del mezzo organico trattato. Se ciò avviene, occorrerà ricominciare la prova riportando la concentrazione della sostanza in esame a un livello al quale non abbia effetti inibitori ed eventualmente anche diminuendone ulteriormente la concentrazione fino a un valore che la renda biodegradata. Tuttavia, se la sostanza in esame (o i liquami) alterano il processo a tutte le concentrazioni testate, si tratta verosimilmente di una sostanza difficile, se non impossibile, da trattare biologicamente, ma potrebbe valere la pena di ripetere la prova con fanghi attivi provenienti da una fonte diversa e/o sottoporli a un'acclimatazione più progressiva.

3. Al contrario, se nella simulazione di prova la sostanza in esame viene eliminata biologicamente al primo tentativo, la sua concentrazione va aumentata nel caso in cui si cerchi di stabilire se tale sostanza possa svolgere azione inibitoria.

4. Quando si tenta di determinare il grado di inibizione, occorre ricordare che la popolazione dei fanghi attivi può evolvere e questo fa sì che, nel tempo, i microrganismi possano sviluppare una tolleranza nei confronti della sostanza chimica inibitrice.

5. Calcolo del grado di inibizione:

   È possibile calcolare le percentuali globali di eliminazione, R_o, di BOD, DOC, COD ecc. nelle unità di prova e di controllo utilizzando la seguente formula:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\%$$

   dove:

   I = concentrazione di BOD, DOC, COD ecc. negli affluenti dei recipienti di prova o di controllo (mg/l)

   E = concentrazioni rispettive negli effluenti (mg/l)

   I ed E devono essere corrette per tenere conto del DOC proveniente dalla sostanza in esame nelle unità di prova, altrimenti la percentuale di inibizione risulterà imprecisa.

▼**M4**

Il grado di inibizione prodotto dalla presenza della sostanza in esame può essere calcolato secondo la formula seguente:

$$\% \text{ di inibizione} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

dove:

R_c = percentuale di eliminazione nei recipienti di controllo

R_t = percentuale di eliminazione dei recipienit di prova

BIBLIOGRAFIA

(1) Reynolds L *et al*. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

(2) Capitolo C.11 del presente allegato, Biodegradazione — Fanghi attivi: saggio di inibizione della respirazione.

(3) ISO 8192 (2007) Water quality - Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.

(4) ISO 15522 (1999) Water Quality - Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

Appendice 5

Sostanze chimiche in esame scarsamente solubili in acqua — sostanze volatili

Sostanze chimiche scarsamente solubili in acqua

Sono stati pubblicati apparentemente pochi studi incentrati su prove di simulazione del trattamento delle acque reflue condotte su sostanze chimiche scarsamente solubili in acqua e insolubili (1) (2) (3).

Non esiste un metodo universale di dispersione di una sostanza chimica applicabile a tutte le sostanze chimiche insolubili. Dei quattro tipi di metodi descritti nella norma ISO 10634 (4), i due che sembrerebbero essere adatti alla dispersione delle sostanze destinate a una prova di simulazione fanno ricorso ad agenti emulsionanti e/o energia ultrasonica. È opportuno determinare la stabilità della dispersione ottenuta su un periodo di almeno 24 ore. Le dispersioni convenientemente stabilizzate, contenute in recipienti costantemente sottoposti ad agitazione (paragrafo 38), sono in seguito introdotte nei recipienti di aerazione, separatamente dai liquami domestici (o artificiali).

Se le dispersioni sono stabili, è necessario esaminare in che modo è possibile determinare la sostanza in esame nella sua forma dispersa. È improbabile che il DOC sia stato determinato in maniera adeguata, e va quindi messo a punto un metodo analitico specifico per la sostanza in esame da applicare agli effluenti, ai solidi degli effluenti e ai fanghi attivi. Il destino della sostanza chimica in esame nella simulazione del trattamento a fanghi attivi sarà in tal caso determinato nelle fasi solide e liquide. È quindi necessario calcolare un «bilancio di massa» per stabilire se la sostanza in esame è stata biodegradata. Tale bilancio, tuttavia, segnala solo la biodegradazione primaria. Sarà necessario dimostrare la biodegradazione completa attraverso un test respirometrico di pronta biodegradabilità [capitolo C.4 del presente allegato (5), lettere C, F o D] utilizzando come inoculo dei fanghi esposti alla sostanza in esame nella prova di simulazione.

Sostanze chimiche volatili

La simulazione del trattamento delle acque reflue con le sostanze chimiche volatili è discutibile e problematica. Come già rilevato per le sostanze poco solubili in acqua, sono apparentemente rari gli studi che descrivono le prove di simulazione con sostanze volatili. Occorre adattare uno strumento classico per la miscelatura integrale turando ermeticamente i recipienti di aerazione e decantazione, misurando e controllando il flusso d'aria con flussimetri, e facendo passare il gas in uscita attraverso trappole che consentono di raccogliere materia organica volatile. In alcuni casi, il gas in uscita viene convogliato verso una trappola fredda tramite una pompa a vuoto, oppure viene estratto mediante la tecnica «*purge and trap*» in una trappola contenente Tenax e gel di silice per analisi gascromatografiche. La sostanza in esame presente nella trappola può essere determinata analiticamente.

La prova viene svolta in due fasi. Le unità vengono messe in funzione inizialmente senza fanghi, pompando i liquami artificiali addizionati della sostanza in esame nel recipiente di aerazione. Per alcuni giorni i campioni di affluenti, effluenti e gas in uscita vengono raccolti e analizzati per determinare la presenza della sostanza in esame. A partire dai dati raccolti, è possibile calcolare la percentuale (R_{vs}) della sostanza in esame estratta dal sistema tramite stripping.

Si conduce in seguito la normale prova biologica (con fanghi attivi), in condizioni sperimentali identiche a quelle utilizzate per lo studio basato sullo stripping, misurando anche il DOC e la COD, per verificare che le unità operino efficacemente. È inoltre opportuno eseguire analisi occasionali per misurare la presenza della sostanza in esame negli affluenti, negli effluenti e nei gas in uscita nel corso della prima parte della prova; dopo l'acclimatazione, le analisi vanno condotte con più frequenza. I dati raccolti allo stato stazionario permettono, di nuovo, di calcolare la percentuale di eliminazione della sostanza in esame nella fase liquida attraverso i processi fisici e biologici (R_T), nonché la proporzione estratta dal sistema (R_V) tramite stripping.

▼**M4**

Calcolo:

a) nella prova non biologica, la percentuale (R_{VP}) della sostanza in esame estratta dal sistema (tramite stripping) può essere calcolata a partire dalla formula:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

dove:

R_{VP} = eliminazione della sostanza in esame per volatilizzazione (%),

S_{VP} = sostanza in esame raccolta nella trappola espressa come concentrazione equivalente nella fase liquida (mg/l),

S_{IP} = concentrazione della sostanza in esame negli effluenti (mg/l);

b) nella prova biologica, la percentuale (R_V) della sostanza in esame estratta dal sistema (tramite stripping) può essere calcolata a partire dalla formula:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

dove:

R_V = eliminazione della sostanza in esame per volatilizzazione nella prova biologica (%),

S_V = sostanza in esame raccolta nella trappola, nella prova biologica, espressa come concentrazione equivalente negli affluenti liquidi (mg/l),

S_I = concentrazione della sostanza in esame negli affluenti (mg/l);

c) nella prova biologica, la percentuale (R_T) della sostanza in esame eliminata attraverso tutti i diversi processi può essere calcolata a partire dalla formula:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

dove:

S_E = concentrazione della sostanza chimica in esame negli effluenti (liquidi) (mg/l);

d) quindi, la percentuale (R_{BA}) rimossa per biodegradazione e per adsorbimento può essere calcolata a partire dalla formula:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

È consigliabile svolgere altre prove per determinare se la sostanza in esame è adsorbita; in tal caso, si potrebbe procedere ad un'ulteriore correzione;

e) un confronto tra la proporzione di sostanza in esame estratta durante la prova biologica (R_v) e durante quella non-biologica (R_{vp}) mostra l'effetto complessivo del trattamento biologico sull'emissione della sostanza in esame nell'atmosfera.

Esempio: Benzene

Tempo di ritenzione dei fanghi = 4 giorni

Tempo di ritenzione del liquame artificiale = 8 h

$S_{IP} = S_I = 150$ mg/l

$S_{VP} = 150$ mg/l ($S_{EP} = 0$)

$S_V = 22{,}5$ mg/l

$S_E = 50$ µg/l

▼**M4**

Pertanto,

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % e R_{BA} = 85 %.

Si è ipotizzato che il benzene non venga adsorbito sui fanghi attivi.

BIBLIOGRAFIA

(1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.

(2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

(3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

(4) ISO 10634 (1995) Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(5) Capitolo C.4 del presente allegato, Determinazione della «pronta» (*ready*) biodegradabilità.

▼M4

Appendice 6

Effetti del tempo di ritenzione dei fanghi sulla trattabilità delle sostanze chimiche

INTRODUZIONE

1. Il metodo qui descritto è stato concepito per verificare se le sostanze chimiche in esame (in generale quelle riconosciute come biodegradabili intrinsecamente ma non prontamente) possono venire biodegradate nei limiti imposti dagli impianti di trattamento delle acque reflue. I risultati sono espressi in termini di percentuali di eliminazione e di biodegradazione. Le condizioni di funzionamento delle unità a fanghi attivi e la scelta degli affluenti da trattare portano a oscillazioni piuttosto marcate della concentrazione della sostanza in esame negli effluenti. Le prove vengono svolte su una sola concentrazione nominale di solidi dei fanghi attivi o su un solo tempo di ritenzione nominale dei fanghi e i regimi di eliminazione dei fanghi esausti descritti possono far variare notevolmente il tempo di ritenzione nel corso della prova, sia da un giorno all'altro che all'interno di una sola giornata.

2. In questa variante (1) (2), il tempo di ritenzione dei fanghi è mantenuto all'interno di limiti molto più stretti nel corso di ciascun periodo di 24 ore (come avviene su vasta scala) e quindi la concentrazione negli effluenti risulta più costante. Si raccomanda l'uso di liquami domestici in quanto generano un tasso più elevato e consistente di eliminazione. Occorre inoltre esaminare gli effetti di un certo numero di valori attinenti ai tempi di ritenzione dei fanghi ed è necessario uno studio più dettagliato per determinare l'incidenza di una gamma di temperature diverse sulla concentrazione degli effluenti.

3. Non esiste ancora un consenso generale sui modelli cinetici che riproducono la biodegradazione delle sostanze chimiche nelle condizioni riscontrabili in un impianto per il trattamento delle acque reflue. Si è scelto di applicare ai dati raccolti il modello di Monod per la crescita batterica e per l'utilizzo del substrato (1) (2), in quanto trattasi di metodo destinato ad essere applicato solo a sostanze chimiche prodotte in grandi quantità e quindi presenti nelle acque reflue in concentrazioni superiori a 1 mg/l. La validità del modello semplificato e delle ipotesi formulate è stata stabilita utilizzando una serie di alcoli etossilati con vari gradi di biodegradabilità primaria (2) (3).

Nota: Questa variante segue da vicino il metodo di prova qui descritto (C.10-A), discostandosene solo nei dettagli illustrati di seguito.

PRINCIPIO DELLA PROVA

4. Si utilizzano delle unità a vaso poroso con fanghi attivi — concepite per facilitare l'eliminazione (quasi) continua di liquami misti grazie a una regolazione molto precisa dei tempi di ritenzione dei fanghi (SRT, o θ_s) — in modo non abbinato, con diversi tempi di ritenzione e, facoltativamente, diverse temperature. Il tempo di ritenzione si situa generalmente tra 2 e 10 giorni e la temperatura tra 5 e 20 °C. Si dosano, separatamente, nelle unità i liquami di preferenza domestici e una soluzione della sostanza in esame, agli intervalli più idonei ad ottenere il tempo di ritenzione richiesto per i liquami (da 3 a 6 ore) e la concentrazione desiderata della sostanza in esame nei liquami da trattare. Le unità di controllo che non ricevono la sostanza in esame funzionano in parallelo, a fini di comparazione.

5. È possibile utilizzare altri tipi di apparecchiature, ma occorre prestare estrema attenzione per assicurare un controllo ottimale dei tempi di ritenzione. Ad esempio, se si utilizzano impianti che comprendono un decantatore, potrebbe essere necessario tener conto della perdita di solidi attraverso gli effluenti. Inoltre, è necessario prendere precauzioni particolari per evitare errori dovuti a variazioni della quantità dei fanghi nei decantatori.

▼M4

6. Le unità sono fatte funzionare nelle varie combinazioni di condizioni scelte e, dopo aver raggiunto l'equilibrio, si misurano le concentrazioni medie della sostanza in esame negli effluenti nello stato stazionario e, facoltativamente, la COD, su un periodo di circa tre settimane. La valutazione della percentuale di eliminazione della sostanza in esame e, facoltativamente, della COD, è espressa da una rappresentazione grafica della relazione tra le condizioni di funzionamento dell'impianto e la concentrazione negli effluenti. A partire da qui è possibile calcolare le costanti cinetiche sperimentali e prevedere le condizioni nelle quali la sostanza in esame può essere trattata.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

7. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafi 12 e 13.

SOGLIE MINIME

8. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafi 14 e 15.

SOSTANZA CHIMICA DI RIFERIMENTO

9. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafo 16.

RIPRODUCIBILITÀ DEI RISULTATI DELLE PROVE

10. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafi 17 e 18.

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiatura

11. Per questo metodo, l'unità adatta è una versione modificata del sistema a vaso poroso (appendice 6.1). Si tratta di un recipiente interno (o rivestimento) in polipropilene poroso di 3,2 mm di spessore, con pori da circa 90 μm e con giunti saldati di testa, che rendono questa unità più robusta rispetto a quella descritta al paragrafo 21 del presente capitolo, C.10-A. Il rivestimento è inserito in un recipiente esterno in polietilene impermeabile composto da due elementi: una base circolare forata (per permettere il passaggio di due tubi di aerazione e di un tubo per lo scarico dei fanghi) e un cilindro superiore avvitato sulla base e provvisto di un'uscita posizionata in modo tale da versare un volume noto (3 l) nel vaso poroso. Uno dei tubi di aerazione è dotato di un diffusore e l'altro è aperto alle estremità e disposto ad angolo retto rispetto al diffusore posto nel recipiente. Questo sistema crea turbolenze sufficienti ad assicurare che i contenuti del recipiente siano mescolati integralmente e a generare concentrazioni dell'ossigeno disciolto superiori a 2 mg/l.

12. Sistemare le unità, in numero adeguato, in un bagnomaria o in ambienti a temperatura costante e termostatizzata tra 5 e 20 °C (± 1 °C). Sono necessarie due pompe per dosare la soluzione della sostanza in esame e dei liquami decantati nei recipienti di aerazione alla portata richiesta (rispettivamente 0-1,0 ml/min e 0-25 ml/min) e una terza pompa per l'eliminazione dei fanghi esausti dai recipienti di aerazione. Il flusso dei fanghi esausti deve essere molto lento ed è ottenuto attraverso una pompa regolata a velocità superiore che funziona a intermittenza grazie a un timer settato, ad esempio, su 10 secondi al minuto, che risulta in un flusso di 3 ml/min e in una portata di fanghi eliminati pari a 0,5 ml/min.

Apparecchio di filtrazione o centrifuga

13. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafo 23.

Apparecchiatura di analisi

14. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafo 24.

Acqua

▼M4

15. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafi 25 e 26.

Mezzo organico

16. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafo 27.

Liquami artificiali

17. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafo 28.

Liquami domestici

18. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafo 29.

Fanghi attivi

19. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafo 30.

Soluzioni madre della sostanza in esame

20. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafi 31 e 32.

PROCEDURA

Preparazione dell'inoculo

21. Si applica il capitolo C.10-A solo il paragrafo 34 — utilizzare fanghi attivi (circa 2,5 g/l).

Numero di unità di prova

22. Nel caso di una prova semplice, ad esempio per misurare unicamente la percentuale di eliminazione, è sufficiente un solo valore di tempo di ritenzione dei fanghi, ma se si vuole ricavare dati necessari a calcolare le costanti cinetiche sperimentali, occorreranno 4 o 5 valori del tempo di ritenzione. I valori scelti si situano generalmente tra 2 e 10 giorni. Risulta più pratico effettuare una prova applicando 4 o 5 diversi valori del tempo di ritenzione dei fanghi simultaneamente alla stessa temperatura; per studi più approfonditi, si utilizzano gli stessi tempi di ritenzione o eventualmente una serie di valori diversi, a temperature diverse situate nell'intervallo tra 5 e 20 °C. La biodegradazione primaria (utilizzo principale) richiede normalmente una sola unità per ciascuna combinazione di condizioni. Tuttavia, per la biodegradazione completa occorre aggiungere un'unità di controllo per ciascuna combinazione di condizioni, destinata ad accogliere i liquami ma non la sostanza in esame. Se si presume che nei liquami utilizzati sia presente la sostanza in esame, è possibile incorporare delle unità di controllo al momento di valutare la biodegradazione primaria e apportare le correzioni necessarie ai calcoli.

Dosaggio del mezzo organico e della sostanza chimica in esame

23. Si applicano i paragrafi da 36 a 39 del capitolo C.10-A, facendo però attenzione a dosare separatamente la soluzione della sostanza in esame e a utilizzare diversi tassi di eliminazione dei fanghi. Occorre inoltre monitorare frequentemente, ad esempio due volte al giorno, e se necessario aggiustare entro ± 10 %, la portata degli affluenti, degli effluenti e dei fanghi esausti. Se i metodi di analisi comportano delle difficoltà per i liquami domestici, si possono utilizzare al loro posto dei liquami artificiali, assicurandosi che i diversi mezzi forniscano dati cinetici paragonabili.

Manipolazione delle unità a fanghi attivi

24. Si applicano i paragrafi da 40 a 43 del capitolo C.10-A, facendo però attenzione a controllare il tempo di ritenzione dei fanghi solo attraverso un'eliminazione a flusso «costante» dei fanghi esausti.

Campionamento e analisi

25. Si applicano i paragrafi da 44 a 50 del capitolo C.10-A, determinando, inoltre, la concentrazione della sostanza in esame ed eventualmente il DOC; la COD non va utilizzata.

▼M4

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

26. Si applica il capitolo C.10 lettera A, paragrafi da 52 a 54.

Espressione dei risultati della prova

27. Si applica il capitolo C.10-A, paragrafi da 56 a 62.

Calcolo delle costanti cinetiche

28. È più realistico esprimere la concentrazione media della sostanza in analisi allo stato stazionario negli effluenti e descrivere come essa vari in funzione delle condizioni di funzionamento dell'impianto, invece che citare la percentuale di biodegradazione primaria. A tal fine è possibile utilizzare l'equazione [6] dell'appendice 6.2, che può fornire i valori dei parametri K_S, μ_m e θ_{SC}, tempo critico di ritenzione dei fanghi.

[Alternativamente, è possibile ottenere i valori di K_S e μm utilizzando un programma informatico semplice che adatta la curva teorica calcolata a partire dall'equazione [2] (appendice 6.2) ai valori sperimentali ottenuti. Anche se la soluzione ottenuta non rappresenterà una risposta assoluta, si può ottenere una ragionevole approssimazione dei valori K_S e μ_m].

Variabilità dei risultati

29. Capita frequentemente di ottenere parametri cinetici variabili per una medesima sostanza. Si ritiene che le condizioni di crescita dei fanghi e le condizioni nella quali si svolge la prova (come al paragrafo 5 e in altre prove) incidano fortemente sui risultati. Un aspetto di tale variabilità è stato esaminato da Grady *et al* (4), che hanno suggerito di applicare i termini «effettiva» e «intrinseca» a due condizioni estreme che rappresentano i limiti dello stato fisiologico raggiungibile da una coltura nel corso di una prova cinetica. Se lo stato si mantiene inalterato nel corso della prova, i valori dei parametri cinetici riflettono le condizioni dell'ambiente dal quale provengono i microrganismi; tali valori vengono detti «effettivi» ovvero attualmente esistenti. All'estremo opposto, se le condizioni della prova sono tali da permettere il pieno sviluppo del sistema di sintesi proteica e quindi il massimo tasso di crescita, i parametri cinetici risultanti vengono detti «intrinseci» e dipendono unicamente dalla natura del substrato e dal tipo di batteri che compongono la coltura. A titolo orientativo, si otterranno valori effettivi mantenendo il rapporto tra concentrazione del substrato e microrganismi degradanti (S_o/X_o) a livelli bassi (ad esempio 0,025), mentre si otterranno valori intrinseci mantenendolo a livelli alti (ad esempio, 20 o oltre). In entrambi i casi, S_o deve essere pari o superiore al valore applicabile di Ks, la costante di semisaturazione.

30. La variabilità e altri aspetti della cinetica di biodegradazione sono stati discussi nel corso di una recente riunione del SETAC (5). Gli studi discussi, sia quelli già pubblicati sia quelli in fase progettuale, dovrebbero presto consentirci di avere un'immagine più chiara della cinetica alla base del trattamento delle acque reflue negli impianti e permetterci quindi una migliore interpretazione dei dati esistenti e di impostare in futuro delle linee guida più pertinenti per i metodi di prova.

BIBLIOGRAFIA

(1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33-48.

(2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340-343.

(3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.

▼**M4**

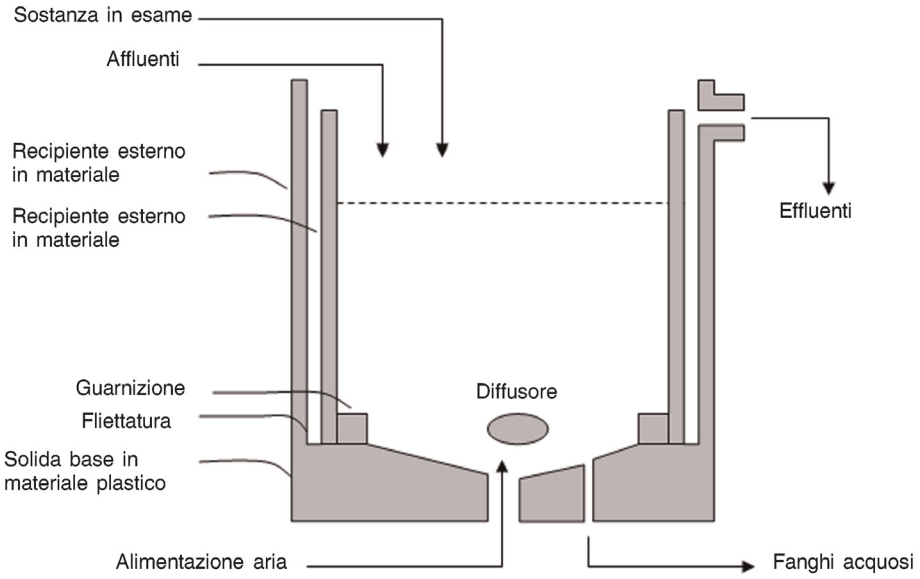
(4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742-748.

(5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼**M4**

Appendice 6.1

Vaso poroso con regolazione del tempo di ritenzione dei fanghi



▼M4

Appendice 6.2

Calcolo delle costanti cinetiche

1. Supponendo che si applichi la cinetica di Monod e tenendo conto di un bilancio di massa dei solidi attivi e del substrato nel sistema a fanghi attivi (1), le seguenti espressioni descrivono lo stato stazionario:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

ovvero

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

dove:

S_1 = concentrazione del substrato negli effluenti (mg/l)

K_S = costante di semisaturazione, concentrazione alla quale $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = tasso di crescita specifico (d^{-1})

μ_m = valore massimo di μ_m (d^{-1})

K_d = velocità di degradazione specifica dei solidi attivi (d^{-1})

θ_S = tempo medio di ritenzione dei fanghi (d)

Lo studio dell'equazione conduce alle seguenti conclusioni:

i) la concentrazione negli effluenti è indipendente da quella negli affluenti (S_0); di conseguenza, la percentuale di biodegradazione varia in funzione della concentrazione negli affluenti, S_0;

ii) l'unico parametro di controllo dell'impianto che incide su S_1 è il tempo di ritenzione dei fanghi θ_S;

iii) a una data concentrazione negli affluenti, S_0, corrisponderà un tempo critico di ritenzione dei fanghi, secondo la seguente formula:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

dove:

θ_{SC} = tempo critico di ritenzione dei fanghi al di sotto del quale i microrganismi competenti vengono eliminati dall'impianto;

iv) dato che gli altri parametri dell'equazione [2] sono associati alla cinetica di crescita, è probabile che la temperatura incida sul livello del substrato degli effluenti e sull'età critica dei fanghi, ovvero, il tempo di ritenzione dei fanghi necessario ad ottenere un certo grado di trattamento aumenta in funzione della diminuzione della temperatura.

2. A partire da un bilancio di massa dei solidi nel sistema a vaso poroso, e supponendo che la concentrazione dei solidi negli effluenti dell'impianto, X_2, sia bassa rispetto a quella nel recipiente di aerazione, X_1, il tempo di ritenzione dei fanghi è dato da:

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼M4

e

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

dove:

V = volume del recipiente di aerazione (l)

X_1 = concentrazione dei solidi nel recipiente di aerazione (mg/l)

X_2 = concentrazione dei solidi negli effluenti (mg/l)

Q_0 = velocità di flusso degli affluenti (l/d)

Q_1 = velocità di flusso dei fanghi esausti (l/d)

Regolando la velocità di flusso dei fanghi esausti, Q_1, è quindi possibile regolare il tempo di ritenzione dei fanghi al determinato valore prescelto.

Conclusioni:

3. Scopo principale della prova è consentire di prevedere la concentrazione della sostanza in esame negli effluenti e, di conseguenza, i livelli di tale sostanza nelle acque che li ricevono.

4. Tracciando S_1 in funzione di θ_S è a volte possibile valutare con facilità il tempo critico di ritenzione dei fanghi, come ad esempio nella curva 3 della figura 1. Se non è possibile farlo, il valore θ_{SC} può essere calcolato, insieme ai valori approssimativi di μ_m e K_S, tracciando S_1, in funzione di $S_1 \bullet \theta_S$.

Riarrangiando l'equazione, si ottiene:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

se il valore di K_d è basso, si ottiene $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$ e [5] diventa:

$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Di conseguenza la curva dovrebbe diventare una retta (cfr. la figura 2) con inclinazione $1/\mu_m$ che interseca K_S/μ_m; inoltre: $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

Figura 1

Tre temperature; cinque tempi di ritenzione dei fanghi

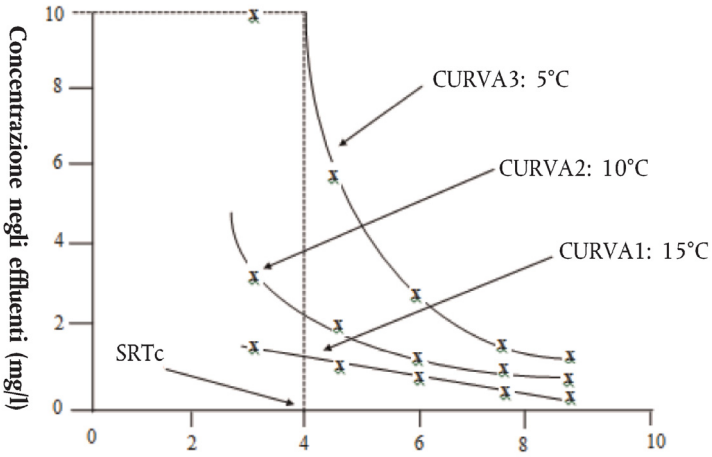
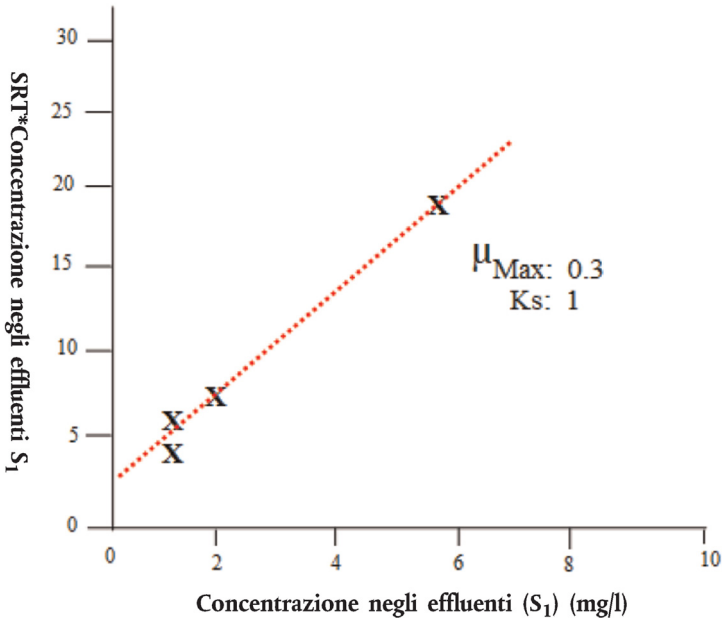


Figura 2

Retta di regressione SRT · S_1 in funzione di S_1 a T = 5 °C



Legenda

Concentrazione negli effluenti

Curva

▼M4

Appendice 7

PROVE SVOLTE A BASSE CONCENTRAZIONI (µg/l)

1. Negli ambienti acquatici, che includono le acque reflue, diverse sostanze chimiche sono spesso presenti a concentrazioni molto basse (µg/l). In tal caso, le sostanze non servono da substrati primari per la crescita ed è invece più verosimile che subiscano una degradazione in quanto substrati secondari che non intervengono nella crescita, parallelamente a una serie di composti a base di carbonio presenti in natura. Di conseguenza, la degradazione di questo tipo di composti non risponde al modello descritto all'appendice 6. Si possono però applicare diversi altri modelli e, date le condizioni prevalentemente presenti nei sistemi di trattamento delle acque reflue, è possibile utilizzare contemporaneamente molti modelli. Occorre svolgere studi molto più approfonditi per chiarire questo punto.

2. Nel frattempo, è possibile applicare la procedura descritta nel presente testo (capitolo C.10-A), ma solo per la biodegradabilità primaria, utilizzando basse concentrazioni idonee (< 100 µg/l) e una procedura di analisi convalidata. È possibile calcolare la percentuale di biodegradazione (cfr. paragrafo 54 del metodo di prova) a condizione che venga tenuto conto dei processi abiotici (adsorbimento, volatilità ecc.). Si può prendere ad esempio lo studio condotto da Nyholm e dai suoi collaboratori (1) (2), con un ciclo di 4 ore in un sistema a riempimento e scarico (*fill and draw*). Lo studio riporta costanti di pseudo primo ordine per le cinque sostanze chimiche addizionate a liquami artificiali, da 5 a 100 µg/l (per la biodegradabilità finale è possibile utilizzare sostanze di prova marcate con ^{14}C). La descrizione di questo processo si situa al di fuori dell'ambito del presente metodo di prova in quanto non si tratta di procedure sulle quali vi è consenso, sebbene un metodo proposto per la norma ISO 14592 (3) contenga delle indicazioni sull'uso delle sostanze chimiche marcate con ^{14}C.

Prova a mezzo di unità semicontinue per fanghi attivi (SCAS)

3. È stata in seguito proposta una prova più semplice, in due fasi (4) (5) (6); il metodo, che prevede il ricorso a unità semicontinue (SCAS), è seguito da prove cinetiche brevi condotte su campioni prelevati dalle unità SCAS. Il sistema SCAS funziona con flussi di fanghi esausti conosciuti (a differenza del metodo originale C.12) e viene alimentato con liquami artificiali ricostituiti secondo la formula OCSE modificata o con liquami domestici. La formula dei liquami artificiali è stata modificata (a causa di un diverso valore di pH e scarsa capacità di sedimentazione dei fanghi) con l'aggiunta di un tampone fosfato, di estratto di lievito, cloruro di ferro (III) e tracce di oligoelementi, inoltre la COD è stata aumentata a circa 750 mg/l incrementando la concentrazione di peptone ed estratti di carne. Le unità hanno funzionato in cicli continui di 24 ore: 23 ore di aerazione, eliminazione dei fanghi esausti, sedimentazione, estrazione del liquido sopranatante (effluenti) seguite dall'aggiunta di liquami artificiali e sostanza in esame, fino a 100 µg/l (vale a dire circa la stessa concentrazione applicata nella prova breve). Una volta la settimana il 10 % della totalità dei fanghi è stata sostituita con fanghi freschi in modo da mantenere l'equilibrio della popolazione microbica.

4. Le concentrazioni della sostanza in esame vengono misurate inizialmente e alla fine della fase di aerazione e la prova viene condotta finché si raggiunge un'eliminazione costante della sostanza: possono essere necessari da una settimana a diversi mesi.

Prova breve

5. Viene svolta una prova breve (es. 8 ore) per determinare la costante di velocità cinetica di pseudo primo ordine per la degradazione della sostanza chimica in esame nei fanghi attivi le cui origini e modalità di sviluppo sono conosciute ma diverse. In particolare, vengono presi campioni di fanghi dai reattori SCAS — alla fine di un periodo di aerazione, quando la concentrazione del substrato è bassa — durante un test di acclimatazione (paragrafi 3 e 4). A scopo di confronto, i fanghi possono essere presi anche da un'unità SCAS operante in

▼M4

parallelo ma non esposta alla sostanza in esame. Aerare le miscele di fanghi e della sostanza in esame aggiunta a due o più concentrazioni nell'intervallo da 1 a 50 µg/l, senza aggiungere liquami artificiali o altro substrato organico. La sostanza in esame rimasta in soluzione viene misurata a intervalli regolari, ad esempio ogni ora, a seconda della sua degradabilità, per non più di 24 ore. Centrifugare i campioni prima di sottoporli ad adeguata analisi.

Calcoli

6. I dati provenienti dalle unità SCAS vengono utilizzati per calcolare la percentuale di eliminazione della sostanza in esame (paragrafo 54). È inoltre possibile calcolare la costante di velocità media, K_1 (corretta, per tenere conto della concentrazione dei solidi in sospensione), ricorrendo alla formula seguente:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

dove:

t = tempo di aerazione (23 ore)

C_e = concentrazione alla fine del periodo di aerazione (µg/l)

C_i = concentrazione all'inizio del periodo di aerazione (µg/l)

SS = concentrazione dei solidi dei fanghi attivi (g/l)

7. Nella prova breve, tracciare il logaritmo della concentrazione percentuale restante in funzione del tempo; la curva della parte iniziale (degradazione 10-50 %) del grafico è equivalente a K_1, la costante di (pseudo) primo ordine. Correggere la costante in funzione della concentrazione dei solidi nei fanghi, dividendo la curva per la concentrazione di tali solidi. Il risultato deve precisare anche le concentrazioni iniziali della sostanza in esame e dei solidi in sospensione, il tempo di ritenzione dei fanghi, il carico e la fonte dei fanghi e indicare, se del caso, un'eventuale pre-esposizione alla sostanza in esame.

Variabilità dei risultati

8. La variabilità e altri aspetti della cinetica di biodegradazione sono stati discussi nel corso di una recente riunione del SETAC (7). Gli studi discussi, sia quelli già pubblicati sia quelli in fase progettuale, dovrebbero presto consentirci di avere un'immagine più chiara della cinetica alla base del trattamento delle acque reflue negli impianti e permetterci quindi una migliore interpretazione dei dati esistenti e di impostare in futuro delle linee guida più pertinenti per i metodi di prova.

BIBLIOGRAFIA

(1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339-353.

(2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505-1510.

(3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼**M4**

(4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851-864.

(5) Berg UT and Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711-735.

(6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

(7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

C.10-B: Biofilm

INTRODUZIONE

1. Generalmente le prove di simulazione vengono svolte sulle sostanze che non superano la prova di screening per la pronta biodegradabilità [capitolo C.4, lettere da A a F, del presente allegato (9)] ma superano invece quella per la biodegradabilità intrinseca. In casi eccezionali, le prove di simulazione vengono applicate anche a sostanze chimiche sulle quali è necessario ottenere maggiori informazioni, specialmente le sostanze prodotte in grandi quantità; normalmente, viene applicata la prova a fanghi attivi (C.10-A). In alcuni casi, tuttavia, sono necessarie informazioni specifiche relative al comportamento di una determinata sostanza quando viene sottoposta a metodi di trattamento delle acque reflue che comportano il ricorso a biofilm, in particolare attraverso l'uso di filtri percolatori, biodischi (*rotating biological contactors*) o letti fluidi; per venire incontro a tale necessità, sono state sviluppate diverse soluzioni.

2. Gerike *et al.* (1) hanno sviluppato delle unità pilota costituite da filtri percolatori di grandi dimensioni, facendole funzionare in modalità abbinata. I filtri occupavano però troppo spazio e richiedevano quantità relativamente elevate di liquami o liquami artificiali. Truesdale *et al.* (2) hanno utilizzato filtri percolatori più piccoli (1,83 m × 0,15 m di diametro) alimentati con liquami naturali privi di tensioattivi, ma che richiedevano comunque quantità significative di liquami. Erano necessarie fino a 14 settimane per sviluppare un biofilm «maturo» e bisognava attendere altre 4-8 settimane, dopo la prima introduzione del tensioattivo in esame, perché avvenisse l'acclimatazione.

3. Baumann *et al.* (3) sono ricorsi a un filtro molto più piccolo che usava «fibra pile» di poliestere precedentemente immersa in fanghi attivi come mezzo inerte di supporto per il biofilm. La sostanza in esame costituiva l'unica fonte di carbonio e la biodegradabilità veniva valutata a partire dalle misure del DOC nell'affluente e nell'effluente e dalla quantità di CO_2 nel gas emesso.

4. Gloyna *et al.* (4) hanno adottato un approccio completamente diverso e a loro si deve l'invenzione del reattore tubolare rotante. Sulla superficie interna del tubo rotante (sull'area della superficie conosciuta) è stato coltivato un biofilm introducendo gli affluenti dall'estremità superiore del tubo (leggermente inclinato rispetto all'asse orizzontale). Il reattore è stato utilizzato per studiare la biodegradabilità dei tensioattivi (5), lo spessore ottimale del biofilm e la diffusione attraverso il film (6). Gloyna *et al.* hanno poi perfezionato e modificato il reattore in modo da poter determinare il CO_2 nel gas emesso.

5. Il reattore tubolare rotante è stato adottato dallo Standing Committee of Analysts del Regno Unito come metodo standard per valutare la biodegradabilità delle sostanze chimiche (7) nonché la trattabilità e tossicità delle acque reflue (8). Il metodo qui descritto presenta il vantaggio di essere semplice, compatto e riproducibile e di richiedere quantità relativamente contenute di mezzo organico.

PRINCIPIO DELLA PROVA

6. Si applicano sulla superficie interna del tubo inclinato, facendolo ruotare lentamente, i liquami (artificiali o domestici) e la sostanza in esame, introdotta separatamente o miscelata. Sulla superficie interna si sviluppa uno strato di microrganismi, simili a quelli presenti sui biofiltri. Il funzionamento del reattore è calibrato in modo da ottenere un'eliminazione adeguata della materia organica e, se necessario, l'ossidazione dell'ammonio.

▼M4

7. Si raccolgono gli effluenti dal tubo e li si fa decantare e/o filtrare prima di analizzarli per verificare la presenza del DOC e/o della sostanza chimica in esame, scegliendo un metodo specifico. Si fanno funzionare in parallelo le unità di controllo che non ricevono la sostanza in esame, a fini di comparazione. Quando si effettuano le misurazioni del DOC negli effluenti, si presume che la differenza fra le concentrazioni medie delle due unità (di prova e di controllo) sia dovuta alla sostanza in esame o ai suoi metaboliti organici. Tale differenza è confrontata con la concentrazione della sostanza chimica in esame (in termini di DOC) negli affluenti, al fine di determinarne l'eliminazione.

8. È generalmente possibile distinguere tra biodegradazione e bioassorbimento osservando con attenzione la curva eliminazione-tempo; normalmente, la biodegradazione può essere confermata da una prova di pronta biodegradazione (consumo di ossigeno e produzione di diossido di carbonio) utilizzando un inoculo acclimatato estratto alla fine della prova dai reattori che hanno ricevuto la sostanza in esame.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

9. È necessario disporre delle caratteristiche di purezza, idrosolubilità, volatilità e adsorbimento della sostanza in esame, in modo da permettere la corretta interpretazione dei risultati.

10. Le sostanze chimiche volatili e scarsamente solubili non possono normalmente essere testate se non dopo aver preso particolari precauzioni (cfr. capitolo C.10-A, appendice 5). È necessario conoscerne la struttura chimica o la formula bruta per calcolare i valori teorici e/o per controllare i valori dei parametri significativi, per esempio ThOD (domanda teorica di ossigeno) e DOC.

11. Le informazioni sulla tossicità della sostanza chimica in esame per i microrganismi (cfr. capitolo C.10-A, appendice 4) possono essere utili per una scelta mirata delle concentrazioni da sottoporre a prova e per interpretare correttamente valori di biodegradazione bassi.

SOGLIE MINIME

12. Originariamente, l'immissione sul mercato dei tensioattivi era subordinata al raggiungimento di un tasso minimo di biodegradazione primaria pari almeno all'80 %. Se il tasso dell'80 % non viene raggiunto, si può applicare la presente prova di simulazione (di conferma) e il tensioattivo è immesso sul mercato solo se viene eliminato più del 90 % della sostanza chimica specifica. In generale, per le sostanze chimiche, il problema di ottenere un risultato positivo o negativo (*pass/fail*) non si pone e la percentuale di eliminazione ottenuta può servire per un calcolo approssimativo della probabile concentrazione nell'ambiente, da utilizzare nella valutazione dei rischi dovuti alle sostanze chimiche. La percentuale di eliminazione del DOC ottenuta in diversi studi su sostanze chimiche pure era superiore al 90 % in oltre tre quarti dei prodotti chimici che presentavano un grado di biodegradabilità significativo ed era superiore all'80 % nel novanta per cento degli stessi.

SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

13. Per assicurare il corretto svolgimento della procedura sperimentale è utile, a volte, testare in parallelo delle sostanze chimiche il cui comportamento è conosciuto. Si può, ad esempio, ricorrere ad acido adipico, 2-fenilfenolo, 1-naftolo, acido difenico e 1-acido naftoico.

RIPRODUCIBILITÀ DEI RISULTATI DELLE PROVE

14. Un laboratorio situato nel Regno Unito ha calcolato una deviazione standard relativa del 3,5 % all'interno delle prove e del 5 % tra le prove (7).

▼M4

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiatura

Reattori tubolari rotanti

15. L'apparecchiatura (cfr. appendice 8, figure 1 e 2) consiste in una serie di tubi acrilici, lunghi 30,5 cm con diametro interno di 5 cm, applicati su ruote con corone in gomma all'interno di una struttura di supporto in metallo. I tubi, la cui superficie interna viene resa ruvida con lana abrasiva, hanno un bordo esterno alto circa 0,5 cm che ne permette il fissaggio sulle ruote; all'estremità superiore (estremità di carico) si trova un bordo interno di 0,5 cm, per la ritenzione dei liquidi. Occorre inclinare i tubi a un angolo di circa un grado rispetto al piano orizzontale, per consentire che il mezzo di prova applicato ai tubi puliti resti in contatto con la loro superficie per il tempo richiesto. Fare girare lentamente le ruote gommate attraverso un motore a velocità variabile. Controllare la temperatura dei tubi collocandoli in una camera a temperatura costante.

16. Porre ciascun reattore tubolare in un tubo leggermente più grande e chiuso da un tappo, assicurandosi che le giunzioni siano a tenuta stagna, in modo da raccogliere in una soluzione alcalina il CO_2 del gas emesso, per poi misurarlo (6).

17. Alimentare ogni tubo con mezzo organico contenente, se del caso, la sostanza in esame; prevedere per ciascun tubo un recipiente della capacità di 20 l per lo stoccaggio di sufficiente mezzo organico per 24 ore (A) (cfr. figura 2). Se richiesto, la sostanza chimica in esame può essere dosata separatamente. Sul fondo di ciascun recipiente di stoccaggio c'è un foro d'uscita collegato attraverso un tubicino idoneo, ad esempio in gomma siliconata, via una pompa peristaltica (B) a un tubicino di alimentazione acrilico o in vetro che entra per 2-4 cm nell'estremità superiore (di carico) del tubo inclinato (C). L'effluente sgocciola quindi dalla parte inferiore del tubo inclinato verso un altro recipiente di stoccaggio (D). Far decantare l'effluente, o filtrarlo, prima di analizzarlo.

Apparecchio di filtrazione — centrifuga

18. I campioni vengono filtrati attraverso filtri a membrana di porosità idonea (diametro d'apertura nominale di 0,45 μm) che adsorbono le sostanze chimiche organiche solubili o rilasciano la minima quantità possibile di carbonio organico. Se i filtri utilizzati rilasciano carbonio organico, occorre lavarli accuratamente con acqua calda per rimuovere il carbonio organico lisciviato. In alternativa si può usare una centrifuga in grado di girare a 40 000 m/s^2.

19. Apparecchiatura di analisi che permette di determinare:

— DOC/carbonio organico totale (TOC) o domanda chimica di ossigeno (COD),

— sostanze chimiche specifiche (HPLC, GC ecc.) se richiesto,

— pH, temperatura, acidità, alcalinità,

— ammonio, nitrito e nitrato, se la prova è svolta in condizioni nitrificanti.

Acqua

20. Acqua di rubinetto, contenente meno di 3 mg/l di DOC.

21. Acqua distillata o deionizzata, contenente meno di 2 mg/l di DOC.

▼M4

Mezzo organico

22. Sono accettati quali mezzo organico i liquami artificiali, quelli domestici o una miscela di entrambi. È stato dimostrato che l'uso di soli liquami domestici genera spesso un maggior tasso di eliminazione del DOC (nelle unità a fanghi attivi) e consente addirittura la biodegradazione di alcune sostanze chimiche che non sono invece biodegradate se si usano liquami artificiali ricostituiti secondo la formula OCSE. Si raccomanda quindi l'uso di liquami domestici. Occorre misurare la concentrazione di DOC (o COD) in ciascun nuovo lotto di mezzo organico e occorre conoscerne l'acidità o l'alcalinità. Se il mezzo organico presenta una bassa acidità o alcalinità potrebbe essere necessario aggiungere un tampone idoneo (idrogenocarbonato di sodio o idrogenofosfato di potassio) per mantenere un pH di circa 7,5 ± 0,5 nel reattore nel corso della prova. La quantità del tampone da aggiungere, e quando aggiungerla, vanno decise caso per caso.

Liquami artificiali

23. Sciogliere per ogni litro di acqua di rubinetto i seguenti composti: 160 mg di peptone; 110 mg di estratto di carne; 30 mg di urea; 28 mg di idrogenofosfato di potassio (K_2HPO_4); 7 mg di cloruro di sodio (NaCl); 4 mg di cloruro di calcio diidrato ($C_aCl_2.2H_2O$); 2 mg di solfato di magnesio eptaidrato ($MgSO_4.7H_20$). Questi liquami artificiali ricostituiti secondo la formula OCSE costituiscono un esempio dove la concentrazione media di DOC negli affluenti è di circa 100 mg/l. In alternativa, utilizzare altre composizioni con la stessa concentrazione di DOC, più prossime ai liquami reali. I liquami artificiali, a base di acqua distillata, possono essere preparati in forma concentrata e conservati a circa 1 °C per una settimana al massimo. Se occorre, diluire con acqua di rubinetto (si tratta, peraltro, di un mezzo organico insoddisfacente in particolare perché la concentrazione di azoto è molto elevata e il tenore di carbonio è relativamente basso, ma non è stata suggerita un'alternativa migliore, se non attraverso l'aggiunta di un tampone fosfato e di peptone).

Liquami domestici

24. Utilizzare liquami freschi decantati raccolti giornalmente in un impianto di trattamento delle acque reflue che riceve principalmente liquami domestici. Occorre prelevare i liquami dallo stramazzo della vasca di sedimentazione primaria oppure dall'alimentazione dell'impianto a fanghi attivi; i liquami devono essere il più possibile privi delle particelle più grosse. I liquami possono essere utilizzati dopo averli stoccati anche per diversi giorni a 4 °C, se è provato che il DOC (o la COD) non sono diminuiti in modo significativo (vale a dire di più del 20 %) in fase di stoccaggio. Al fine di limitare eventuali perturbazioni al sistema, occorre correggere il DOC (o la COD) di ogni nuovo lotto a un valore adeguato costante prima dell'uso, ad esempio diluendolo con acqua.

Lubrificante

25. Per lubrificare i rulli della pompa peristaltica, utilizzare glicerolo od olio d'oliva: entrambi sono adatti per i tubi in gomma siliconata.

Soluzioni madre della sostanza in esame

26. Per le sostanze che presentano una solubilità adeguata, preparare delle soluzioni madre a concentrazioni idonee (es.: da 1 a 5 g/l) in acqua deionizzata o nella frazione minerale dei liquami artificiali. Per le sostanze insolubili, cfr. capitolo C.10-A, appendice 5; non applicare il metodo alle sostanze chimiche volatili senza prima modificare i reattori tubolari (paragrafo 16). Determinare il DOC e il TOC della soluzione madre e ripetere le misure per ciascun nuovo lotto. Se la differenza tra il DOC e il TOC supera il 20 %, verificare l'idrosolubilità della sostanza chimica in esame. Confrontare il DOC o la concentrazione della sostanza in esame misurata attraverso un'analisi specifica della

▼M4

soluzione madre a valore nominale, per assicurarsi che il tasso di recupero sia sufficiente (solitamente deve superare il 90 %). Verificare, in particolare per le dispersioni, se il DOC può essere utilizzato come parametro analitico, o se invece si possa applicare solo una tecnica d'analisi specifica per la sostanza in esame. Le dispersioni impongono il ricorso alla centrifuga dei campioni. Per ciascun nuovo lotto, misurare DOC, COD o la sostanza in esame attraverso un'analisi specifica.

27. Determinare il pH della soluzione madre. I valori estremi indicano che l'aggiunta della sostanza chimica può influenzare il pH dei fanghi attivi nel sistema di prova. In tal caso, neutralizzare la soluzione madre per ottenere un pH di 7 ± 0,5 ricorrendo a piccole quantità di acido o di base inorganica, evitando però la precipitazione della sostanza in esame.

PROCEDURA

Preparazione del mezzo organico da dosare

28. Pulire accuratamente, all'inizio e durante la prova, tutti i recipienti destinati ad affluenti ed effluenti e i tubi che li collegano, per eliminare la proliferazione microbica.

29. Preparare giornalmente liquami artificiali freschi (paragrafo 23) a partire dai solidi o dalla soluzione madre concentrata, diluendo con acqua di rubinetto. Misurare la quantità richiesta in un cilindro e aggiungerla in un recipiente per gli affluenti, pulito. Inoltre, se necessario, aggiungere la quantità richiesta della soluzione madre della sostanza in esame o della sostanza di riferimento ai liquami artificiali prima della diluizione. Per praticità o per evitare eventuali perdite della sostanza, prepararne a parte una soluzione diluita, in un recipiente separato, e caricarla nei tubi inclinati attraverso una diversa pompa dosatrice.

30. In alternativa (e preferibilmente), usare liquami domestici decantati freschi (paragrafo 24), se possibile raccolti giornalmente.

Funzionamento dei reattori tubolari rotanti

31. Per valutare una singola sostanza chimica sono necessari due identici reattori tubolari, installati in un ambiente a temperatura costante, normalmente a 22 ± 2 °C.

32. Regolare la pompa peristaltica in modo da caricare 250 ± 25 ml/h del mezzo organico (senza sostanza chimica) nei tubi inclinati, che dovranno ruotare a 18 ± 2 rpm. Applicare il lubrificante (paragrafo 25) ai tubicini della pompa, all'inizio e a intervalli regolari durante la prova, per assicurare un funzionamento corretto e prolungare la durata dei tubicini.

33. Regolare l'angolo di inclinazione dei tubi rispetto al piano orizzontale, in modo da produrre un tempo di residenza di 125 ± 12,5 sec per il carico nel tubo pulito. Fare una stima del tempo di ritenzione aggiungendo al liquido erogato un marcatore non biologico (es.: NaCl, colorante inerte): il tempo necessario a raggiungere la massima concentrazione negli effluenti viene considerato tempo medio di ritenzione (nel momento di massimo sviluppo del film, il tempo di ritenzione può aumentare fino a 30 minuti circa).

34. È stato confermato che i tassi, le velocità e i tempi indicati producono percentuali di eliminazione adeguate (> 80 %) del DOC (o COD) ed effluenti nitrificati. La portata del flusso va modificata se l'eliminazione è insufficiente o se va simulato il funzionamento di un particolare impianto di depurazione. In quest'ultimo caso, occorre continuare a regolare il dosaggio del mezzo organico fino a ottenere una prestazione del reattore identica a quella dell'impianto di depurazione.

▼M4

Inoculazione

35. In caso si faccia uso di liquami artificiali, l'inoculazione per via aerea può essere sufficiente ad avviare la proliferazione dei microrganismi; altrimenti aggiungere al liquido erogato 1 ml/l di liquami decantati, per 3 giorni.

Misurazioni

36. Verificare, ad intervalli regolari, che i dosaggi e le velocità di rotazione rientrino nei limiti richiesti. Inoltre, misurare il pH degli effluenti, specialmente se si prevede che si verifichi nitrificazione.

Campionamento e analisi

37. Il metodo, la modalità e la frequenza del campionamento vengono scelti in funzione dello scopo prefisso della prova. Ad esempio, è possibile prelevare campioni di affluenti o effluenti con un campionamento istantaneo oppure su un periodo più lungo (es.: 3-6 ore). Nel corso del primo periodo, e quindi senza sostanza chimica in esame, prelevare dei campioni due volte la settimana. Filtrare i campioni tramite membrane o centrifugarli a circa 40 000 m/sec^2 per più o meno 15 minuti (paragrafo 18). Potrebbe essere necessario far decantare e/o passare i campioni da un filtro grossolano prima di filtrarli tramite membrane. Determinare il DOC o la COD almeno due volte e, se richiesto, il BOD, l'ammonio e i nitriti/nitrati.

38. Dopo la raccolta e la preparazione dei campioni, occorre svolgere le analisi il più rapidamente possibile. In caso fosse necessario rimandare le analisi, conservare i campioni a circa 4 °C al buio, in bottiglie piene ed ermeticamente chiuse. Se è necessario stoccare i campioni per più di 48 h, la conservazione può avvenire tramite congelazione, acidificazione o aggiunta di una sostanza tossica idonea [es. 20 ml/l di una soluzione di cloruro di mercurio (II) a 10 g/l]. Assicurarsi che la tecnica di conservazione non incida sui risultati dell'analisi.

Periodo di attivazione

39. Si tratta del periodo nel quale il biofilm cresce fino ad ottenere lo spessore ottimale: generalmente due settimane e comunque non più di sei. L'eliminazione (paragrafo 44) del DOC (o della COD) aumenta e raggiunge un valore di plateau: una volta raggiunto un valore di plateau simile in entrambi i tubi, sceglierne uno che diventerà l'unità di controllo per il resto della prova, durante la quale le loro prestazioni devono rimanere coerenti.

Addizione della sostanza chimica in esame

40. A questo punto, aggiungere all'altro tubo reattore la sostanza chimica in esame nella concentrazione richiesta, di solito 10-20 mg C/l, mentre nel reattore di controllo viene aggiunto solo il mezzo organico.

Periodo di acclimatazione

41. Continuare a svolgere analisi con cadenza bisettimanale per il DOC (o la COD) e, se è necessario valutare la biodegradabilità, misurare anche la concentrazione della sostanza in esame attraverso analisi specifiche. Lasciare acclimatare per un periodo da una a sei settimane (o più a lungo se sussistono condizioni particolari) dopo la prima addizione della sostanza in esame. Quando la percentuale di eliminazione (paragrafi 43-45) raggiunge il valore massimo, ottenere 12-15 valori validi nella fase di plateau nel corso di 3 settimane per calcolare la percentuale media di eliminazione. La prova è considerata conclusa se si è raggiunta una percentuale di eliminazione sufficientemente alta. La prova non deve generalmente estendersi al di là delle 12 settimane a partire dalla prima addizione della sostanza in esame.

▼M4

Distacco del biofilm

42. Dalle pareti dei tubi si distaccano, ad intervalli piuttosto regolari, delle grandi quantità di biofilm. Per assicurare che ciò non incida sulla confrontabilità dei risultati, fare in modo che le prove coprano un periodo equivalente ad almeno due cicli completi di crescita e distacco.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

43. Per ogni valutazione programmata, calcolare la percentuale di eliminazione della sostanza in esame in termini di DOC (o di COD) ricorrendo alla seguente equazione:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\%$$

dove:

D_t = percentuale di eliminazione del DOC o della COD al tempo t;

C_s = concentrazione del DOC (o della COD) negli affluenti dovuta alla sostanza chimica in esame, preferibilmente stimata a partire dalla concentrazione della soluzione madre immessa (mg/l) e dal suo volume;

E = valore del DOC (o della COD) misurato negli effluenti di prova al tempo t (mg/l);

E_o = valore del DOC (o della COD) misurato negli effluenti di controllo al tempo t (mg/l).

Ripetere il calcolo per la sostanza chimica di riferimento, se sottoposta a prova.

Prestazioni del reattore di controllo

44. Il grado di eliminazione del DOC o della COD (D_B) dal mezzo organico dell'unità di controllo è utile per valutare l'attività di biodegradazione del biofilm nel corso della prova. Calcolare la percentuale di eliminazione ricorrendo alla seguente equazione:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\%$$

dove:

C_m = DOC (o COD) del mezzo organico negli affluenti di controllo (mg/l).

45. Calcolare l'eliminazione (D_{ST}) della sostanza in esame, se misurata, ricorrendo a un metodo di analisi specifico ad ogni misurazione, con la seguente equazione:

$$DST = 100\ (1 - Se/Si)\%$$

dove:

Si = concentrazione misurata o, preferibilmente, stimata della sostanza chimica in esame negli affluenti di prova (mg/l)

Se = concentrazione misurata della sostanza chimica in esame negli effluenti di prova al tempo t (mg/l)

▼M4

Se il metodo di analisi produce un valore positivo nei liquami non arricchiti equivalente a Sc mg/l, calcolare la percentuale di eliminazione (D_{SC}) ricorrendo alla seguente equazione:

$$DSC = 100\ (Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\ \%$$

Espressione dei risultati della prova

46. Tracciare su un grafico le curve dell'eliminazione D_t e D_{ST} (o D_{SC}), se del caso, in funzione del tempo (cfr. capitolo C.10-A, appendice 2). Utilizzare la media (arrotondata all'unità più vicina) e la deviazione standard dei 12-15 valori ottenuti per D_T (e per D_{ST}, se disponibile) durante la fase di plateau, come percentuale di eliminazione della sostanza in esame. A partire dall'andamento della curva di eliminazione si possono trarre alcune conclusioni sui processi di eliminazione.

Adsorbimento

47. Se già dall'inizio della prova si osserva una forte eliminazione della sostanza in esame in termini di DOC, la sostanza è stata probabilmente eliminata tramite adsorbimento sul biofilm. Dovrebbe essere possibile confermare tale ipotesi determinando la quantità della sostanza in esame adsorbita sui solidi distaccati dal film. È raro che l'eliminazione del DOC delle sostanze adsorbibili si mantenga elevata nel corso di tutta la prova; normalmente, il grado di eliminazione è elevato all'inizio per poi declinare progressivamente fino a raggiungere un valore di equilibrio. Tuttavia, se la sostanza chimica adsorbibile in esame fosse tale da causare, in un modo o nell'altro, un'acclimatazione della popolazione microbica, l'eliminazione del DOC della sostanza chimica aumenterebbe fino a raggiungere un elevato valore di plateau.

Fase di latenza

48. Molte delle sostanze chimiche in esame, analogamente a quanto avviene nelle prove di screening statiche, attraversano una fase di latenza prima che avvenga una biodegradazione a pieno regime. Nel corso della fase di latenza, l'acclimatazione o l'adattamento dei batteri degradanti avviene senza che si produca, o quasi, l'eliminazione della sostanza in esame; in seguito i batteri cominciano a proliferare. Al termine di questa fase, quando circa il 10 per cento della quantità iniziale della sostanza in esame viene eliminata (compreso anche per adsorbimento, se del caso) si suppone, arbitrariamente, che inizi la fase di degradazione. Il tempo di latenza è spesso notevolmente variabile e scarsamente riproducibile.

Fase di plateau

49. La fase di plateau di una curva di eliminazione in un test in continuo è definita come la fase nella quale si raggiunge il massimo livello di degradazione. La fase dovrebbe protrarsi per almeno 3 settimane ed essere determinata attraverso la misurazione di 12-15 valori validi.

Grado medio di eliminazione della sostanza chimica in esame

50. Calcolare il valore medio a partire dai valori di eliminazione D_t (e D_{st}, se disponibile) della sostanza in esame durante la fase di plateau. Arrotondata all'unità più vicina (1 %), tale media rappresenta il grado di eliminazione della sostanza in esame. Si raccomanda inoltre di calcolare l'intervallo di confidenza (95 %) del valore medio. Utilizzare lo stesso metodo per calcolare il valore medio (D_B) di eliminazione del mezzo organico nel recipiente di controllo.

▼M4

Indicazione della biodegradazione

51. Se la sostanza in esame non viene adsorbita in modo significativo sul biofilm e se la curva di eliminazione presenta il profilo tipico di una curva di biodegradazione con fasi di latenza, di degradazione e di plateau (cfr. paragrafi 48 e 49), l'eliminazione misurata può essere attribuita con certezza alla biodegradazione. Se il livello di eliminazione è alto in fase iniziale, la prova di simulazione non consente di distinguere tra i processi di eliminazione biologici e abiotici. In questi casi, come nei casi in cui la biodegradazione suscita dubbi (ad esempio, quando si osserva un fenomeno di stripping), occorre analizzare le sostanze in esame adsorbite su campioni del biofilm oppure effettuare prove di biodegradazione statiche supplementari basate su parametri che indicano chiaramente i processi biologici. Si tratta di prove che si basano sul consumo di ossigeno (capitolo C.4 del presente allegato, lettere D, E e F) o sulla produzione di CO_2 (capitolo C.4-C, del presente allegato, ovvero prova del CO_2 nello spazio di testa) (10); occorre usare come inoculo del biofilm pre-esposto proveniente dal reattore idoneo.

52. Se sono state misurate sia l'eliminazione del DOC sia l'eliminazione della sostanza chimica specifica, la presenza di differenze significative (essendo la prima inferiore alla seconda) tra le percentuali indica che gli effluenti contengono dei prodotti organici intermedi probabilmente più difficili da degradare rispetto al composto progenitore, che vanno sottoposti ad analisi.

Validità dei risultati della prova

53. Il test è da considerare valido se il grado di eliminazione del DOC (o della COD), D_B, nelle unità di controllo è superiore all'80 % dopo due settimane e se non si osserva alcun fenomeno insolito.

54. Se è stata testata una sostanza (di riferimento) prontamente biodegradabile, il grado di biodegradazione deve essere superiore al 90 % e la differenza tra i valori determinati nelle repliche non deve eccedere il 5 %. Se i due criteri non vengono soddisfatti, è necessario rivedere le procedure sperimentali e/o prelevare i liquami domestici da un'altra fonte.

55. Analogamente, i valori di biodegradazione ottenuti nelle unità replica dove è stata trattata la sostanza in esame (se ne sono state utilizzate), non devono presentare differenze superiori al 5 %. Se questo criterio non viene rispettato ma i tassi di eliminazione sono alti, occorre continuare le analisi per altre tre settimane. Se il tasso di eliminazione è basso, si devono studiare gli effetti inibitori della sostanza chimica, se non sono già conosciuti, e ripetere la prova con una concentrazione più bassa della sostanza, se possibile.

Relazione

56. La relazione sulla prova deve includere le seguenti informazioni:

Sostanza chimica in esame:

— dati identificativi,

— natura fisica e, se del caso, proprietà chimico-fisiche.

Condizioni sperimentali:

— qualsiasi modifica al sistema di prova, specialmente se vengono utilizzate sostanze insolubili o volatili,

— tipo di mezzo organico,

— proporzione e natura degli effluenti industriali presenti nei liquami, se l'informazione è pertinente e conosciuta,

— modalità di inoculazione,

▼M4

— soluzione madre della sostanza in esame: tenore in DOC (carbonio organico disciolto) e TOC (carbonio organico totale); modalità di preparazione, se si tratta di una sospensione; concentrazione o concentrazioni usate per la prova; giustificare, eventualmente, i valori che si discostano dall'intervallo 10-20 mg/l di DOC; modalità di addizione; data della prima addizione; eventuali cambiamenti nella concentrazione,

— tempo medio di ritenzione idraulica (senza crescita); velocità di rotazione del tubo; angolo di inclinazione approssimativo, se possibile,

— dettagli sul distacco del biofilm; tempo e intensità,

— temperatura della prova e gamma di temperature,

— tecniche di analisi utilizzate.

Risultati della prova:

— tutti i dati derivanti dalle misurazioni: DOC, COD, analisi specifiche, pH, temperatura, sostanze azotate, se rilevante,

— tutti i valori calcolati per D_t (o D_{tc}) D_B e D_S, presentati sotto forma di tabella e di curve di eliminazione,

— informazioni sulle fasi di latenza e di plateau, la durata della prova, il grado di eliminazione della sostanza in esame, della sostanza di riferimento (se testata) e del mezzo organico (nell'unità di controllo), insieme ad informazioni statistiche e conclusioni sulla biodegradabilità e sulla validità della prova,

— discussione dei risultati.

BIBLIOGRAFIA

(1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat Res. 14: 753-758.

(2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material.Wat. Waste Tr. J. 7: 441-444.

(3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355-1357.

(5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92-94.

(6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865-881.

(7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

(8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

(9) Capitolo C.4 del presente allegato, Determinazione della «pronta» (*ready*) biodegradabilità, lettere da A a F.

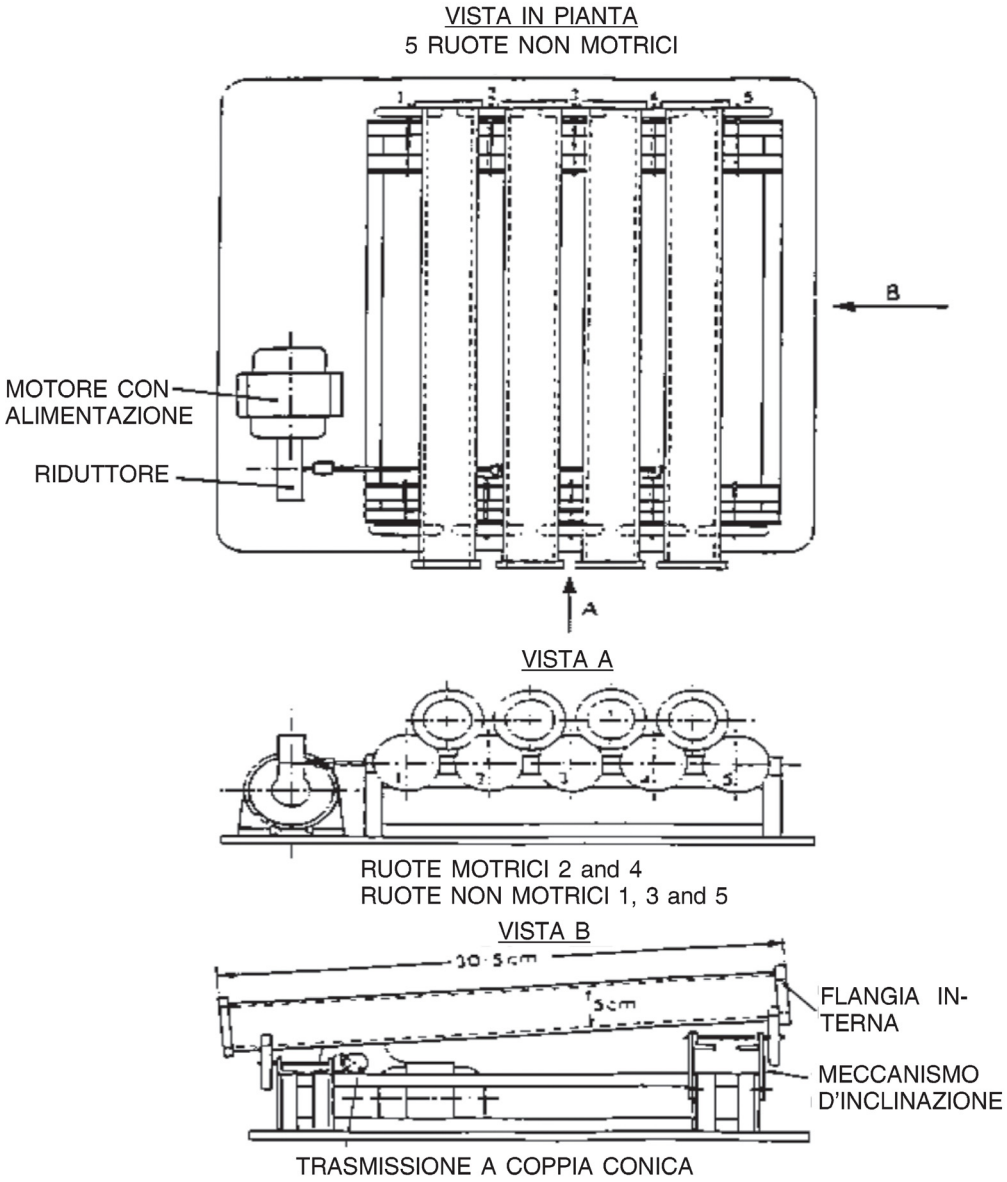
(10) ISO 14593 (1998) Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

▼**M4**

Appendice 8

Figura 1

Tubi rotanti



Legenda:

Vista in pianta

Vista A/B

Ruote motrici

Ruote non motrici

Motore con alimentazione

Riduttore

Flangia interna

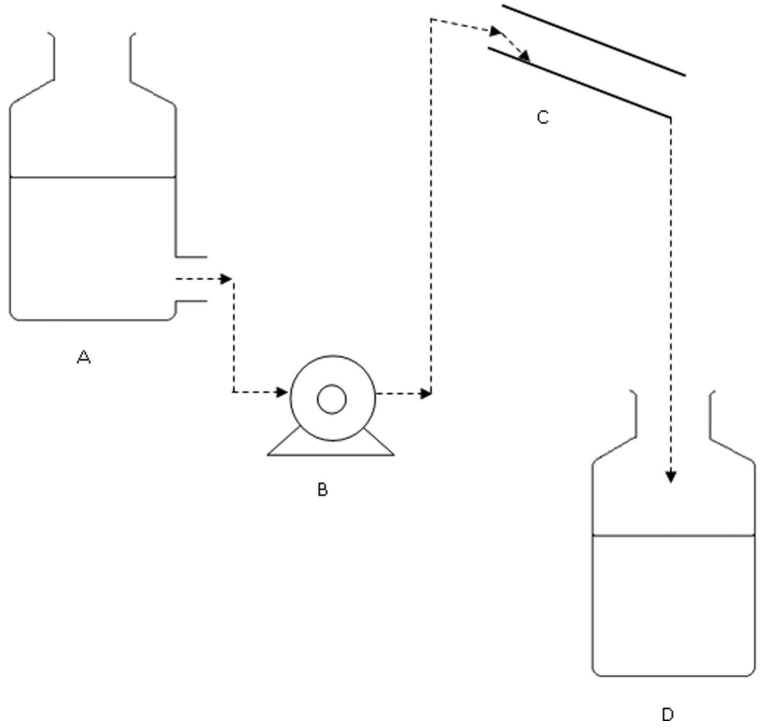
Meccanismo d'inclinazione

Trasmissione a coppia conica

▼M4

Figura 2

Schema di flusso



A: Recipiente di alimentazione

B: Pompa peristaltica

C: Tubo rotante

D: Recipiente di raccolta degli effluenti

DEFINIZIONI

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

Sostanza chimica (in inglese chemical): occorre notare che il termine «*chemical*» viene ampiamente utilizzato negli accordi UNCED e nei documenti posteriori e include sostanze, prodotti, miscele, preparazioni o qualsiasi altro termine utilizzato nei sistemi esistenti per descrivere i prodotti chimici in questione.

▼M6

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 inibitrici 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 EC_{50} 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-alliltiourea, 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 EC_{50} 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-alliltiourea 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]).

([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).

▼**M6**

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 EC_{50}) 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-alliltiourea, 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-alliltiourea).

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).

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 EC_{50} 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.

▼M6

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) pentaidrato 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 EC_{50} 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 EC_{50} del 3,5-DCP non si situa nell'intervallo previsto, occorre ripetere la prova con fanghi attivi provenienti da un'altra fonte. Il valore EC_{50} del solfato di rame (II) pentaidrato 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:

a) recipienti di prova — usare ad esempio becher da 1 000 ml per contenere 500 ml di miscela di reazione (cfr. punto 5, fig. 1);

b) 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;

c) agitatori e ancorette magnetici, ricoperti di materiale inerte, destinati ad essere utilizzati nella camera di misurazione e/o nei recipienti di prova;

d) 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

▼M6

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/s^2.

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 ($CaCl_2,2H_2O$)	0,4 g
— solfato di magnesio eptaidrato ($MgSO_4,7H_20$)	0,2 g
— monoidrogenofosfato di potassio anidro (K_2HPO_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.

▼M6

18. In alternativa, i componenti del mezzo di coltura possono essere sterilizzati individualmente prima dello stoccaggio, 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 H_2SO_4.

23. Se la sostanza chimica di riferimento è il solfato di rame (II) pentaidrato, 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 disciolta in autoclave con 234 ml di acqua di rubinetto. Il solfato di rame (II) pentaidrato è facilmente solubile. A prova iniziata, vengono aggiunti 16 ml di liquame artificiale e 250 ml di fanghi attivi.

▼M6

Inibitore specifico della nitrificazione

24. Occorre preparare una soluzione madre di 2,32 g/l di N-alliltiourea (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 situi 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 mm^2). 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/s^2) 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

▼M6

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.

▼M6

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'uopo (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 prestabiliti, 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

▼M6

anche N-alliltiourea a 11,6 mg/l. Queste miscele vanno aerate e incubate a 20° ± 2 °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				
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				
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 (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).

▼M6

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. EC_{50}), 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,

▼M6

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 di:

— 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 contribuiscano 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

▼M6

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 O_2. 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:

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

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:

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

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:

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

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).

▼M6

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 esprimerli in ordine di grandezza, per esempio:

EC_{50}	< 1 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 mg/l

Interpretazione dei risultati

EC_x

▼M6

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 EC_{50} 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 $p \leq 0,05$.

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 O_2/(g fanghi × h);

— insieme dei dati calcolati, curva o curve di inibizione e metodo di calcolo di EC_{50},

— EC_{50} e, se possibile, limiti di confidenza al 95 %, eventualmente EC_{20}, EC_{80}; eventualmente NOEC e metodi statistici utilizzati, se non è possibile determinare il valore EC_{50};

— 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.

▼**M6**

(2) King, E. F. and Painter H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1(1): 27-39.

(3) 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-orgranisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471-483.

(7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1:515-524.

(8) Robra, B. (1976). Wasser/Abwasser 117, 80.

(9) Fiebig S. and Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test — acc. to the OECD guideline 209. *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.

(10) ISO (1995). ISO 10634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in aqueous medium, International Organization for Standardization.

(11) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

▼M6

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, EC_{50} 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.

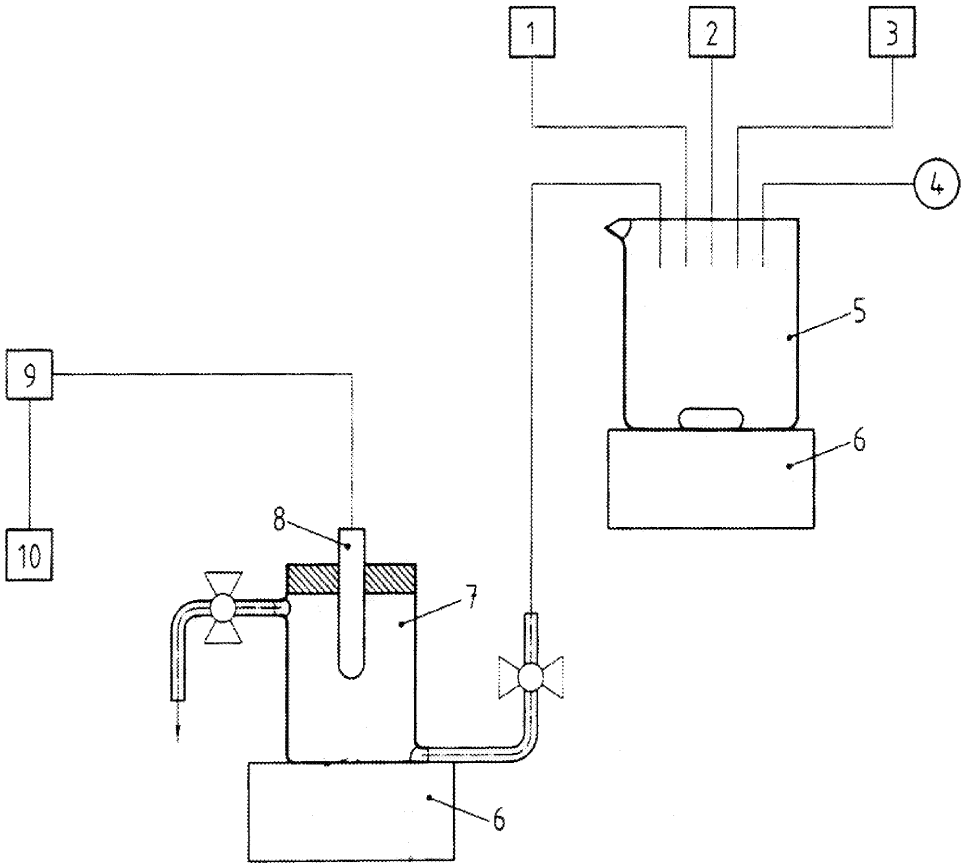
NOEC (no observed effect concentration — concentrazione senza effetti osservabili): concentrazione della sostanza chimica in esame alla quale non si osserva alcun effetto. Nella presente prova, in un determinato periodo di esposizione, la concentrazione che corrisponde alla NOEC non ha alcun effetto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

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

▼**M6**

Appendice 2

Figura 1 — **Esempi di dispositivi di misurazione**



Legenda

1 fanghi attivi

2 mezzo artificiale

3 sostanza chimica in esame

4 aria

5 recipiente di miscelazione

6 agitatore magnetico

7 cella per la misurazione dell'ossigeno

8 elettrodo a ossigeno

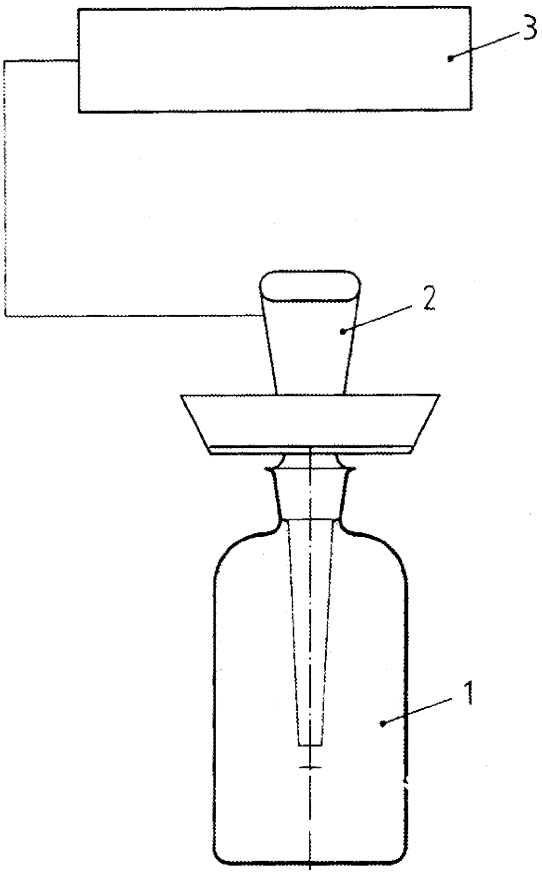
9 strumento per la misurazione dell'ossigeno

10 dispositivo di registrazione

▼**M6**

Appendice 3

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



Legenda

1 recipiente di prova

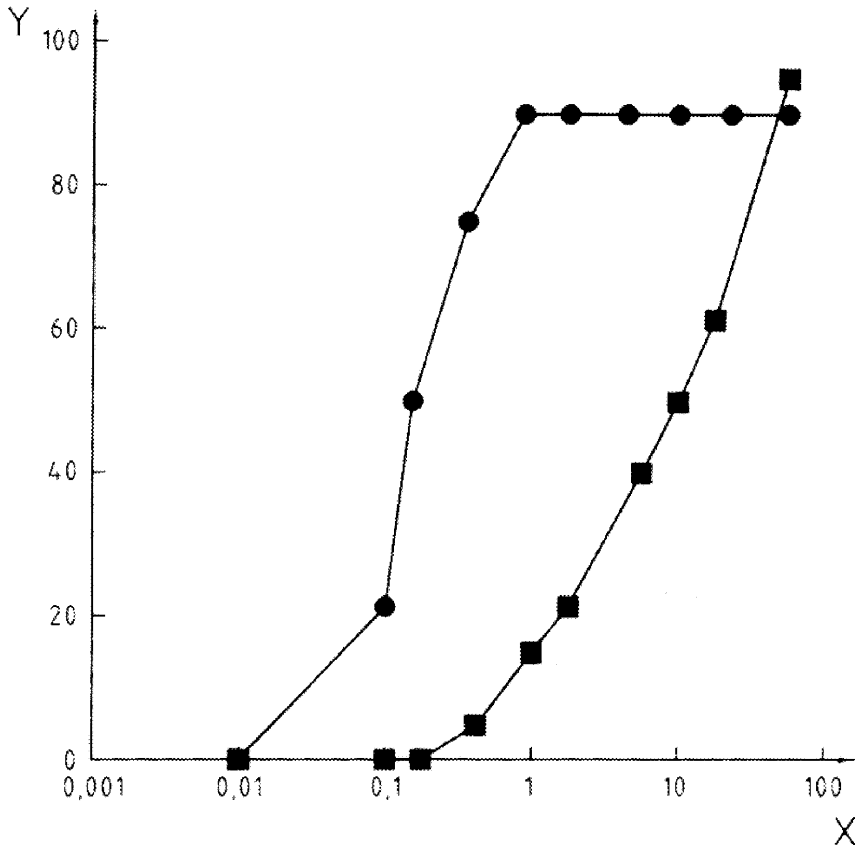
2 elettrodo a ossigeno

3 strumento per la misurazione dell'ossigeno

▼**M6**

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.

▼B

C.12. **BIODEGRADAZIONE**

SAGGIO SCAS MODIFICATO

1. **METODO**

1.1. INTRODUZIONE

Scopo del metodo è quello di valutare la potenziale biodegradabilità ultima di sostanze organiche solubili in acqua e non volatili, esposte per un lungo periodo a concentrazioni relativamente elevate di microorganismi. La vitalità dei microorganismi viene mantenuta per tutto il periodo aggiungendo giornalmente liquami decantati. (Per l'intervallo di fine settimana, i liquami possono essere conservati a 4 °C. In alternativa si può usare il liquame sintetico del saggio di conferma OCSE.)

Nell'interpretazione dei risultati occorre tenere conto dell'eventuale assorbimento fisico-chimico della sostanza in esame sui solidi in sospensione (cfr. paragrafo 3.2).

A causa del lungo periodo di ritenzione della fase liquida (36 ore) e dell'aggiunta intermittente di nutrienti, la prova non riproduce le stesse condizioni che si hanno in un impianto per il trattamento dei liquami. I risultati ottenuti con diverse sostanze indicano che il sistema ha un elevato potenziale di biodegradazione.

Le condizioni sperimentali sono estremamente favorevoli alla selezione e/o all'adattamento di microorganismi capaci di degradare il composto in esame (si può seguire questo procedimento anche per produrre inoculi acclimatati da utilizzare in altri saggi).

Nel presente metodo la biodegradabilità ultima delle sostanze in esame viene determinata attraverso la misura della concentrazione del carbonio organico disciolto (DOC) (è preferibile determinare il DOC dopo acidificazione e depurazione anziché dalla differenza $C_{totale} — C_{inorganico}$).

L'impiego simultaneo di un metodo analitico specifico consente di determinare la degradazione primaria della sostanza (modifica della struttura chimica della sostanza in esame).

Il metodo può essere applicato soltanto alle sostanze organiche che alle concentrazioni impiegate per il saggio:

— sono solubili in acqua (almeno 20 mg/l di carbonio organico disciolto),

— hanno una tensione di vapore trascurabile,

— non esercitano effetti inibitori sui batteri,

— non vengono assorbite in modo significativo dal sistema sperimentale,

— non vengono sottratte alla soluzione in esame mediante formazione di schiume.

Occorre determinare il contenuto di carbonio organico della sostanza in esame.

▼B

Per l'interpretazione dei risultati ottenuti, in particolare nei casi in cui i valori siano bassi o trascurabili, sarà utile disporre di informazioni sulle proporzioni relative dei principali componenti della sostanza in esame.

Per l'interpretazione di eventuali valori bassi e per la scelta di una concentrazione adeguata al saggio, può essere utile disporre di informazioni sulla tossicità della sostanza per i microorganismi.

1.2. DEFINIZIONI E UNITÀ

C_T = concentrazione della sostanza in esame espressa come carbonio organico presente o addizionato al liquame sedimentato all'inizio dei periodo di aerazione (mg/l)

C_t = concentrazione del carbonio organico disciolto rinvenuto nel surnatante del saggio alla fine del periodo di aerazione (mg/l)

C_c = concentrazione del carbonio organico disciolto rinvenuto nel surnatante del controllo alla fine del periodo di aerazione (mg/l)

Nel presente metodo la biodegradazione è definita come eliminazione del carbonio organico. La biodegradazione può essere espressa come:

1) la rimozione percentuale D_{Da} della sostanza aggiunta giornalmente:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

dove:

D_{da} = degradazione/aggiunta giornaliera.

2) la rimozione percentuale D_{ssd} di sostanza rispetto a quella presente all'inizio di ogni giorno:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\ (a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\ (b)]$$

dove:

D_{ssd} = degradazione/sostanza iniziale giornaliera.

Gli indici i e (i + 1) si riferiscono al giorno in cui si effettua la misurazione.

L'equazione 2(a) è consigliata se il DOC dell'effluente varia giornalmente mentre l'equazione 2(b) può essere usata quando il DOC dell'effluente rimane relativamente costante da un giorno all'altro.

▼B

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

In alcuni casi quando si esamina una nuova sostanza, possono essere utili delle sostanze di riferimento; ciò nonostante non si propogono qui sostanze di riferimento specifiche.

Nell'appendice I vengono forniti dati relativi a numerosi composti analizzati in un saggio interlaboratorio soprattutto per consentire di tanto in tanto la calibrazione del metodo e per rendere possibile il confronto dei risultati quando se ne adotta un altro.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

I fanghi arrivi provenienti da un impianto di trattamento dei liquami vengono posti in una unità semicontinua per fanghi attivi (SCAS). Si aggiungono il composto in esame e liquame domestico sedimentato; si effettua l'aerazione della miscela per 23 ore. Quindi si interrompe l'aerazione, si lasciano decantare i fanghi e si rimouve il surnatante.

I fanghi che rimangono nella camera di aerazione vengono quindi mescolati con un'altra aliquota del composto in esame e del liquame, e si ripete il ciclo.

La biodegradazione si ricava determinando la quantità di carbonio organico disciolto nel surnatante. Tale valore viene confrontato con quello trovato nel surnatante del controllo contenente soltanto liquame decantato.

Se si utilizza un metodo analitico specifico si possono determinare le variazioni di concentrazione della sostanza in esame dovute alla biodegradazione (biodegradabilità primaria).

1.5. CRITERI DI QUALITÀ

La riproducibilità di questo metodo basato sulla rimozione di carbonio organico disciolto non è stata ancora dimostrata. (Se si prende in considerazione la biodegradazione primaria si ottengono dati molto precisi per sostanze che siano estesamente degradate.)

La sensibilità del metodo dipende soprattutto dalla variabilità del bianco ed in minor misura dalla precisione della determinazione del carbonio organico disciolto e dalla quantità del composto in esame presente nel liquido all'inizio di ogni ciclo.

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO

1.6.1. *Preparazioni*

Per ciascuna sostanza in esame e per i controlli si collega un numero sufficiente di unità di aerazione pulite (in alternativa si può usare l'unità originale per il saggio SCAS da 1,5 litri) con i tubi di presa dell'aria (figura 1). L'aria compressa inviata nelle unità di saggio, purificata con un filtro di cotone grezzo, deve essere esente da carbonio organico e satura di acqua per ridurre le perdite per evaporazione.

Da un impianto di trattamento a fanghi attivi adibito prevalentemente a liquami domestici si preleva un campione di liquido chiarificato, contenente da 1 a 4 g/l di solidi sospesi. Per ciascuna unità di aerazione occorrono circa 150 ml di liquido chiarificato.

▼B

Si preparano con acqua distillata le soluzioni madri della sostanza in esame; di solito è richiesta una concentrazione di 400 mg/l di carbonio organico che, se non ha luogo biodegradazione, corrisponde ad una concentrazione di sostanza in esame pari a 20 mg/l di carbonio all'inizio di ogni ciclo di aerazione.

Se la tossicità per i microorganismi lo consente si possono avere concentrazioni più elevate.

Si misura la concentrazione di carbonio organico nelle soluzioni madri.

1.6.2. *Condizioni del saggio*

Il saggio va effettuato da 20 a 25 °C.

Si utilizza un'elevata concentrazione di microorganismi aerobici (da 1 a 4 g/l di solidi sospesi) ed il periodo di ritenzione effettivo è di 36 ore. In genere, otto ore dopo l'avvio di ciascun ciclo di aerazione, il carbonio organico contenuto nei liquami immessi è ampiamente ossidato. Dopo ha inizio la respirazione endogena del fango che si manterrà per tutto il rimanente periodo di aerazione, durante il quale il solo substrato disponibile è la sostanza in esame a meno che non venga anch'essa metabolizzata rapidamente. Questi fattori, unitamente alla reinoculazione giornaliera del sistema (cfr. paragrafo 1.4), nel caso in cui si usino come mezzo liquami domestici, crea condizioni estremamente favorevoli sia per l'acclimatazione, sia per ottenere elevati valori di biodegradazione.

1.6.3. *Esecuzione del saggio*

Si preleva un campione del liquido chiarificato da un idoneo impianto a fanghi attivi per il trattamento di liquami in prevalenza domestici oppure da un impianto di laboratorio e si mantiene in condizioni aerobiche sino all'impiego in laboratorio. Si riemie ciascuna unità di aerazione e l'unità di controllo con 150 ml (se si utilizza l'unità originale per il saggio SCAS, moltiplicare i volumi per 10) di liquido chiarificato e si avvia l'aerazione. Dopo 23 ore si interrompe l'aerazione e si lasciano decantare i fanghi per 45 minuti. Si apre, a turno, il rubinetto di ogni recipiente e si prelevano aliquote da 100 ml di surnatante. Si prepara, immediatamente prima dell'impiego, un campione di liquami domestici decantati e se ne aggiungono 100 ml al fango che rimane in ciascuna unità di aerazione. Si avvia nuovamente l'aerazione. A questo punto non si aggiunge la sostanza da esaminare e si alimentano giornalmente le unità con liquami domestici fino a quando si forma per decantazione un surnatante chiaro. In genere questa fase richiede al massimo due settimane e nel frattempo il carbonio organico disciolto nel surnatante raggiunge alla fine di ogni ciclo di aerazione un valore costante.

Terminata questa fase, i singoli fanghi sedimentati vengono mescolati tra loro e 50 ml di tale miscela vengono introdotti in ciascuna unità.

95 ml di liquame sedimentato e 5 ml di acqua vengono aggiunti all'unità di controllo, e 95 ml di liquame sedimentato più 5 ml della soluzione madre della sostanza in esame (400 mg/l) vengono aggiunti alle unità di saggio. Si riavvia l'aerazione e si protrae per 23 ore. Si lasciano quindi sedimentare i fanghi per 45 minuti, si preleva il surnatante e se ne analizza il contenuto di carbonio organico disciolto.

Le suddette operazioni di riempimento e di prelievo, vengono ripetute ogni giorno per tutta la durata del saggio.

▼B

Prima della sedimentazione può essere necessario pulire le pareti delle unità per evitare che si accumulino solidi al di sopra del livello del liquido. Per evitare contaminazioni incrociate si utilizza un raschiatore o una spazzola diversa per ciascuna unità.

Idealmente, il carbonio organico disciolto nei surnatanti dovrebbe essere determinato ogni giorno anche se si può consentire una minore frequenza delle analisi. Prima delle analisi i liquidi vengono filtrati mediante filtri a membrana con pori da 0,45 µm lavati oppure vengono centrifugati. Il filtri a membrana sono idonei se durante la filtrazione non liberano carbonio organico né assorbono la sostanza in esame. Nella centrifuga la temperatura del campione non deve superare i 40 gradi centrigradi.

La durata del saggio per i composti che mostrano una biodegradazione limitata o nulla non è fissata, ma l'esperienza suggerisce che la durata dovrebbe essere, in generale, di almeno 12 settimane, ma non più lunga di 26 settimane.

2. **DATI E VALUTAZIONE**

I valori del carbonio organico disciolto rilevati nei surnatanti delle unità di saggio e delle unità di controllo vengono riportati in grafico in funzione del tempo.

Con il procedere della biodegradazione i valori determinati nel saggio si avvicinano a quelli del controllo, Quando la differenza tra i due livelli si mantiene costante per oltre tre misurazioni consecutive, si esegue un numero di ulteriori misurazioni, tale da effettuare una elaborazione statistica dei dati e da calcolare la biodegradazione percentuale subita dalla sostanza in esame (D_{da} oppure D_{ssd}, cfr. paragrafo 1.2).

3. **RELAZIONE**

3.1. RELAZIONE SUL SAGGIO

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

— tutte le informazioni sul tipo di liquame, sul tipo di unità usata e sui risultati sperimentali concernenti le sostanze esaminate, la sostanza di riferimento, se usata, ed il bianco,

— la temperatura,

— la curva di rimozione, nonché descrizione e metodo di calcolo relativi (cfr. paragrafo 1.2),

— date e luogo di prelievo dei fanghi attivi e del liquame, stato di adattamento, concentrazione, ecc.,

— motivazioni scientifiche di eventuali modifiche del procedimento,

— firma e data.

▼B

3.2. INTERPRETAZIONI DEI RISULTATI

Dato che le sostanze esaminate con il presente metodo non sono facilmente biodegradabili, qualsiasi rimozione del DOC imputabile esclusivamente alla biodegradazione avviene in genere gradualmente nel corso di giorni o settimane, ad eccezione di quei casi in cui avviene una improvvisa acclimatazione indicata da una brusca scomparsa che si verifica dopo alcune settimane.

In ogni caso l'assorbimento chimico-fisico può a volte giocare un ruolo importante; ciò si verifica quando all'inizio della prova si riscontra una parziale o completa rimozione del DOC aggiunto. Ciò che accade successivamente, dipende da fattori quali il grado di assorbimento e la concentrazione di solidi sospesi nell'effluente di scarico. Di solito la differenza tra concentrazione del DOC nel controllo e nei surnatanti del saggio aumenta gradualmente rispetto al basso valore iniziale e tale differenza si mantiene quindi al nuovo valore per il resto della prova a meno che non si verifichi l'acclimatazione.

Se si vuole distinguere nel grafico la biodegradazione (o la parziale biodegradazione) dall'assorbimento, sono necessari ulteriori saggi. Questi possono essere effettuati in diversi modi: il più convincente è quello di usare il surnatante o i fanghi come inoculo in un saggio del dossier di base (preferibilmente il saggio respirometrico).

Le sostanze che in questo saggio mostrano un'elevata rimozione del DOC, non dovuta ad assorbimento, devono essere considerate potenzialmente biodegradabili. Un'eliminazione parziale non dovuta ad assorbimento indica che la sostanza è almeno in parte biodegradabile.

Valori bassi o nulli di rimozione del DOC possono essere dovuti ad un effetto inibente della sostanza in esame sui microorganismi, il che può anche essere evidenziato da lisi o da riduzione dei fanghi con formazione di surnatanti torbidi. Il saggio deve essere ripetuto a concentrazione più bassa della sostanza in esame.

Il ricorso a un metodo analitico specifico o alla marcatura della sostanza in esame con il ^{14}C può permettere una maggiore sensibilità. Nel caso di composti marcati con ^{14}C lo sviluppo di $^{14}CO_2$ confermerà che la biodegradazione ha avuto luogo.

Quando i risultati vengono presentati anche come biodegradazione primaria occorre dare, se possibile, una spiegazione del cambiamento di struttura chimica che causa la diminuzione di risposta della sostanza in esame.

Si deve dimostrare la validità del metodo analitico e riportare la risposta fornita dal bianco.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) OCSE, Parigi 1981, *Linea Guida 302 A,* decisione C(81) 30 def. del Consiglio.

▼B

Appendice 1

Saggio SCAS: Esempio di risultati

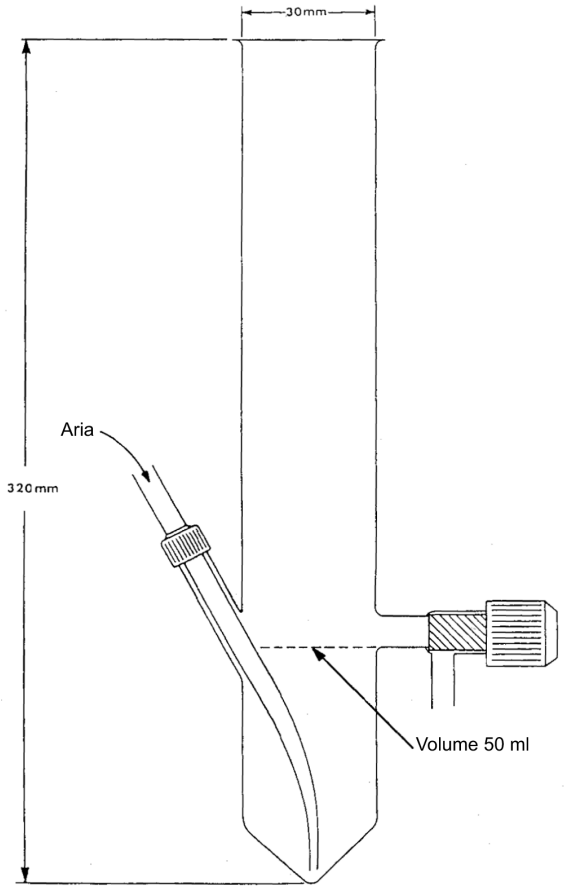
Sostanza	(mg/l)	C_t — C_c (mg/l)	Biodegradazion* percentuale D_{da}	Durata del saggio (giorni)
4-acetil aminobenzen sulfonato	17,2	2,0	85	40
Tetrapropilene benzen sulfonato	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenolo	16,9	0,8	95,3	40
Glicol dietilenico	16,5	0,2	98,8	40
Anilina	16,9	1,7	95,9	40
Ciclopentano tetra carbossilato	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Appendice 2

Esempio di apparecchiatura per il saggio

Figura 2



▼M7

C.13. BIOACCUMULO NEI PESCI: ESPOSIZIONE ATTRAVERSO L'AMBIENTE ACQUATICO E PER VIA ALIMENTARE

INTRODUZIONE

Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 305 (2012). L'obiettivo principale della presente revisione del metodo di prova è duplice. In primo luogo, essa è intesa a includere una prova di bioaccumulo per via alimentare ([1]) idonea a determinare il potenziale di bioaccumulo delle sostanze a bassa solubilità in acqua. In secondo luogo, intende elaborare un metodo di prova che utilizzi, ove possibile, un minor numero di pesci nel rispetto del principio del benessere degli animali, e che risulti più efficiente in termini di costi.

Negli ultimi anni, dopo l'adozione del metodo di prova C.13 consolidato (1), sono state saggiate numerose sostanze e tanto i laboratori che le autorità di regolamentazione hanno maturato una notevole esperienza. Ciò ha portato alla convinzione che la prova possa essere semplificata in presenza di determinate condizioni (cfr. paragrafo 88) e che sia possibile adottare un approccio graduale. L'esperienza ha anche dimostrato che i fattori biologici quali la crescita e il contenuto lipidico del pesce possono avere un forte impatto sui risultati e che pertanto è necessario tenerne conto. Inoltre, è stato riconosciuto che la sperimentazione su sostanze scarsamente solubili in acqua non è tecnicamente realizzabile. Inoltre, per le sostanze con scarsa idrosolubilità in acqua, l'esposizione attraverso l'ambiente acquatico può essere meno importante rispetto all'esposizione per via alimentare. Per questo motivo è stato sviluppato un metodo di prova in cui i pesci sono esposti alla sostanza da testare attraverso la dieta (cfr. paragrafi 7-14 e 97). La validazione (mediante prova interlaboratorio) del metodo con esposizione per via alimentare è stata eseguita nel 2010 (51).

Le principali modifiche apportate al metodo di prova sono le seguenti:

— si può ormai considerare sufficiente testare un'unica concentrazione quando il fattore di bioconcentrazione (BCF) è con ogni probabilità indipendente dalla concentrazione;

— è possibile, in presenza di criteri specifici, elaborare una prova ridotta di esposizione in ambiente acquatico, con un numero limitato di punti di campionamento;

— il contenuto lipidico del pesce dovrebbe essere misurato in modo che il BCF possa essere espresso sulla base di un tenore di grassi del 5 %.

— maggiore enfasi sulla stima del fattore di bioconcentrazione (BCF) cinetico (se possibile), in aggiunta alla stima del BCF allo stato stazionario;

— per alcuni gruppi di sostanze, sarà proposta una prova mediante esposizione per via alimentare, se ciò è ritenuto più adatto rispetto ad una prova di esposizione in ambiente acquatico;

— il peso del pesce va misurato in modo che il BCF_k possa essere corretto dall'effetto di diluizione dovuto alla crescita.

Prima di effettuare le prove di bioaccumulo, devono essere note le seguenti informazioni sulla sostanza in esame:

a) sensibilità del metodo d'analisi per la misurazione delle concentrazioni presenti nei tessuti, nell'acqua o nel cibo sia della sostanza in esame sia dei suoi possibili metaboliti (cfr. paragrafo 65);

b) solubilità in acqua [metodo di prova A.6 (2)]; va determinata secondo un metodo adatto per l'intervallo (stimato) di solubilità in acqua, in modo da ottenere un valore affidabile. Per le sostanze idrofobe si adopererà in genere il metodo di eluizione su colonna;

([1]) Cfr. appendice 1, Definizioni e unità di misura.

▼M7

c) coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua K_{ow} [metodi di prova A.8, A.24, A.23 (5) (4) (6)]; ([1]) o altre informazioni adeguate sul comportamento della ripartizione (ad esempio, l'assorbimento di lipidi, Koc); questa dovrebbe essere determinata secondo un metodo adeguato per l'intervallo (stimato) di K_{ow} per ottenere un valore affidabile. Per sostanze idrofobe, il metodo adeguato sarà quello dell'agitazione lenta [metodo di prova A.23 (6)];

d) stabilità della sostanza in acqua (idrolisi [metodo di prova C.7 (7)];

e) stabilità della sostanza negli alimenti (in particolare quando è scelto il metodo di prova relativo all'esposizione per via alimentare);

f) informazioni sulla fototrasformazione pertinenti per le condizioni di irraggiamento durante la prova (8);

g) tensione superficiale (per sostanze per le quali non è possibile determinare il log K_{ow}) [metodo di prova A.5 (9)];

h) pressione di vapore [metodo di prova A.4 (10)];

i) informazioni sulla degradazione biotica o abiotica nell'acqua, quali (ma non esclusivamente) la biodegradabilità rapida [metodo di prova C.4, parti da II a VII (11) C.29 (12)], se del caso;

j) informazioni sui metaboliti: struttura, log K_{ow}, formazione e degradabilità, se del caso;

k) costante di dissociazione dell'acido (pK_a) delle sostanze che potrebbero ionizzare. Se necessario, il pH dell'acqua di prova deve essere regolato in modo da garantire che la sostanza si trovi in forma non ionizzata durante la prova, se compatibile con la specie ittica.

Indipendente dal sistema di campionamento o metodo di esposizione prescelto, il presente metodo descrive una procedura per caratterizzare il potenziale di bioaccumulo di una sostanza nei pesci. Benché i sistemi di prova a flusso continuo siano ampiamente preferibili, sono ammissibili sistemi semistatici, purché i criteri di validità (cfr. paragrafi 24 e 113) siano soddisfatti. Quando si utilizza il canale dell'esposizione alimentare, il sistema a flusso continuo non è necessario per mantenere concentrazioni acquose della sostanza in esame, ma contribuirà a mantenere un'adeguata concentrazione dell'ossigeno disciolto e ad assicurare acqua pulita e a eliminare le influenze, ad es. prodotti da escrezione.

Indipendentemente dal metodo di prova prescelto, il presente metodo di prova fornisce sufficienti dettagli per eseguire la prova e al contempo lasciare la necessaria libertà per adattare il disegno sperimentale alle specifiche condizioni di laboratorio e alla variabilità delle caratteristiche delle sostanze analizzate. La prova relativa all'esposizione in ambiente acquatico è applicata appropriatamente alle sostanze organiche stabili con valori log K_{ow} tra 1,5 e 6,0 (13), ma è applicabile anche a sostanze fortemente idrofobe (con log $K_{ow} > 6,0$), se può essere dimostrata una concentrazione della sostanza in esame stabile e pienamente disciolta in acqua. Se una siffatta concentrazione non può essere dimostrata, lo studio in acqua non sarebbe adeguato; pertanto, si renderebbe necessario ricorrere all'approccio relativo all'esposizione per via alimentare per saggiare una determinata sostanza nei pesci (anche se l'interpretazione e l'applicazione dei risultati della prova con esposizione alimentare può dipendere dal quadro normativo). Le stime preliminari del fattore di bioconcentrazione (BCF) (indicato talvolta con K_B) per le sostanze organiche con valori di log K_{ow}, fino a circa 9,0 si possono ricavare dall'equazione di Bintein et al. (14). La stima preliminare del

([1]) Talvolta indicati con P_{OW}; determinati con il metodo del dibattimento in pallone nel metodo di prova A.8 (3), con il metodo HPLC nel metodo di prova A.24 (4) e con il metodo dell'agitazione lenta nel metodo di prova A.23 (5). La tecnica del generatore a colonna è talvolta utilizzata per la determinazione di log K_{OW}. Un numero limitato di studi che utilizzano questa tecnica è disponibile, essenzialmente per le dibenzo-diossine e i difenili clorurati (e.g. Li and Doucette, 1993) (3). Per le sostanze ionizzabili, il log K_{OW} dovrebbe fare riferimento alla forma non ionizzata.

▼M7

fattore di bioconcentrazione per tali sostanze fortemente idrofobe può essere più elevata del fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario (BCF_{SS}) prevedibilmente ottenuto mediante esperimenti di laboratorio, in particolare quando si utilizza un semplice modello lineare per la stima preliminare. I parametri che caratterizzano il potenziale di bioaccumulo includono la costante cinetica di assorbimento (k_1), costanti del tasso di perdita compresa la costante cinetica di depurazione (k_2), il fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario (BCF_{SS}), il fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_k) e il fattore di biomagnificazione alimentare (BMF) ([1]).

Le sostanze radiomarcate in esame possono agevolare l'analisi dei campioni di pesce, acqua o cibo e possono essere utilizzate per stabilire se è necessario identificare e quantificare i metaboliti. Se si misurano solo i residui radioattivi totali (per esempio per combustione o solubilizzazione dei tessuti), il BCF o il BMF si basa sulla sostanza madre totale, eventuali metaboliti trattenuti e anche sul carbonio assimilato. I valori BMF o BCF basati sui residui radioattivi totali non sono pertanto confrontabili direttamente con un BCF o BMF ottenuto mediante analisi chimica specifica della sola sostanza madre. Procedure di separazione, quali TLC, HPLC o GC possono essere impiegate negli studi con marcatore radioattivo prima dell'analisi per determinare il BCF o BMF basato sulla sostanza madre ([2]). Quando si utilizzino tecniche di separazione, vanno eseguite l'identificazione e la quantificazione della sostanza madre e dei relativi metaboliti (cfr. paragrafo 65) se si basano i valori BCF o BMF sulla concentrazione della sostanza madre nei pesci e non sui residui radiomarcati totali ([3]). È anche possibile combinare uno studio sul metabolismo o studio di distribuzione in vivo con uno studio di bioaccumulo mediante l'analisi e l'identificazione dei residui nei tessuti. La possibilità di metabolismo può essere prevista mediante strumenti adeguati (ad esempio l'OCSE Toolbox (15) e programmi QSAR proprietari).

La decisione sull'opportunità di effettuare una prova di esposizione per via alimentare o attraverso l'ambiente acquatico, e con quale dispositivo di prova, dovrebbe essere basata sugli elementi di cui al paragrafo 3 nonché sulla normativa in vigore. Ad esempio, per sostanze che hanno un elevato log K_{ow}, ma continuano a presentare un'elevata solubilità in acqua, per quanto riguarda la sensibilità dei metodi d'analisi disponibili, va considerata in primo luogo un'esposizione attraverso l'ambiente acquatico. Tuttavia è possibile che le informazioni sull'idrosolubilità non siano definitive per questi tipi di sostanze idrofobe, pertanto prima di decidere il metodo da utilizzare (16) va esaminata la possibilità di preparare concentrazioni disciolte nell'ambiente acquatico stabili e misurabili (le emulsioni stabili non sono ammesse) utilizzabili per uno studio sull'esposizione attraverso l'ambiente acquatico. Non è possibile dare istruzioni esatte sulla metodologia da seguire in funzione dei criteri di esclusione della solubilità in acqua e del coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua, in quanto altri fattori (tecniche di analisi, degradazione, adsorbimento, ecc.) possono avere notevoli ripercussioni sulla applicabilità del metodo, per i motivi sopra esposti. Tuttavia, a partire da un log K_{ow} superiore a 5 e di una solubilità in acqua inferiore ~ 0.01-0,1 mg/l le prove da esposizione attraverso l'ambiente acquatico diventano sempre più difficili.

Devono essere considerati altri fattori che possono influenzare la scelta della prova, tra cui il contenuto del potenziale d'adsorbimento nei recipienti e nei dispositivi di prova, la sua stabilità in soluzione acquosa rispetto alla stabilità nel mangime per pesci (17) (18), ecc.

Altri studi in ambiente acquatico possono contenere informazioni sugli aspetti pratici. Maggiori informazioni sulla valutazione di aspetti relativi all'esecuzione di studi di bioaccumulo sono disponibili in letteratura [cfr. ad esempio (19)].

Per le sostanze per le quali la solubilità o il mantenimento della concentrazione acquosa e l'analisi di questa concentrazione non rappresentano alcun vincolo alla realizzazione di un'esposizione in ambiente acquatico, tale metodo deve essere preferito per determinare il potenziale di bioconcentrazione della sostanza. In ogni caso, è necessario verificare che la o le concentrazioni di esposizione in

([1]) Cfr. appendice 1, Definizioni e unità di misura.

([2]) CPT: cromatografia su strato sottile; HPLC: cromatografia liquida ad alta pressione; GC: cromatografia in fase gassosa.

([3]) In alcuni quadri normativi le analisi dei metaboliti possono essere obbligatorie qualora siano soddisfatte talune condizioni (cfr. paragrafo 65).

▼M7

ambiente acquatico da applicare rientrino nell'intervallo della solubilità nel mezzo di prova. Diversi metodi possono essere utilizzati per mantenere stabili le concentrazioni della sostanza in esame disciolta, quali l'uso di soluzioni madre o di sistemi di dosaggio passivo (ad esempio metodo dell'eluizione su colonna), purché si possa dimostrare che le concentrazioni possono essere mantenute stabili e i mezzi di prova rispettano le raccomandazioni di cui al paragrafo 27).

Per le sostanze fortemente idrofobe (log K_{ow} > 5 e una solubilità inferiore ~ 0,01-0,1 mg/l), le prove tramite esposizione in ambiente possono diventare sempre più problematiche. La difficoltà può venire dal fatto che non si riesce a mantenere la concentrazione acquosa ad un livello ritenuto sufficientemente costante (ad esempio, a causa di fenomeni di as/desorbimento verso i contenitori di vetro o di un rapido assorbimento dei pesci) o del fatto che le concentrazioni da applicare sono basse e si situano nello stesso ordine di grandezza del limite analitico di quantificazione o sono inferiori allo stesso ([1]). Per queste sostanze fortemente idrofobe, si raccomanda di effettuare la prova per via alimentare, a condizione che tale prova sia coerente con il quadro normativo pertinente e gli obblighi di valutazione dei rischi.

Per i tensioattivi, occorre esaminare la fattibilità della prova di bioconcentrazione in ambiente acquatico, tenendo conto delle proprietà della sostanza; in caso contrario lo studio per via alimentare è probabilmente più adeguato. I tensioattivi sono agenti di superficie, che riducono la tensione interfacciale tra due liquidi. La loro natura anfifilica (vale a dire che contengono sia un gruppo idrofilo sia un gruppo idrofobo) fa sì che si accumulino alle interfacce, quali l'interfaccia acqua-aria, l'interfaccia acqua-cibo e pareti di vetro, il che impedisce di determinare la loro concentrazione acquosa.

La sperimentazione per via alimentare può eludere talune difficoltà di esposizione a miscele complesse i cui componenti presentano differenti limiti di solubilità in acqua, in quanto è più probabile ottenere un'esposizione comparabile di tutti i componenti della miscela per via alimentare rispetto ad un'esposizione in ambiente acquatico [cfr. (20)].

Va osservato che il metodo per via alimentare permette di ottenere un fattore di biomagnificazione alimentare (BMF) e non un fattore di bioconcentrazione (BCF) ([2]). Sono disponibili metodi per stimare un fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_k) a partire dai dati ottenuti nello studio per via alimentare (come discusso nell'appendice 8), ma dovrebbero essere utilizzati con cautela. In generale, tali metodi presuppongono una cinetica di primo ordine e sono applicabili soltanto a determinati gruppi di composti. È improbabile che tali approcci possano essere applicati ai tensioattivi (cfr. paragrafo 12).

Un impianto di prova minimo di esposizione in ambiente acquatico con un minor numero di punti di campionamento per ridurre il numero di animali e/o delle risorse (cfr. paragrafi 83 e segg.) dovrebbe essere applicato esclusivamente alle sostanze per le quali vi sia motivo di ritenere che l'assorbimento e la depurazione seguano approssimativamente una cinetica di primo ordine (vale a dire, in generale, le sostanze organiche non ionizzate, cfr. paragrafo 88).

C.13 — I PROVA DI BIOCONCENTRAZIONE NEI PESCI PER ESPOSIZIONE ATTRAVERSO L'AMBIENTE ACQUATICO

PRINCIPIO DEL METODO

La prova consta di due fasi: la fase di esposizione (assorbimento) e di post-esposizione (depurazione). Durante la fase di assorbimento, un gruppo di pesci di una stessa specie viene esposto alla sostanza in esame ad una o più concentrazioni prescelte, in funzione delle caratteristiche della sostanza in esame (cfr. paragrafo 49). Essi vengono poi trasferiti in un ambiente esente dalla sostanza in esame per la fase di depurazione. È sempre necessaria una fase di depurazione, salvo che la quantità di sostanza assorbita durante la fase di assorbimento sia

([1]) In generale, le concentrazioni misurate nell'acqua durante la fase di assorbimento dovrebbero essere di almeno un ordine di grandezza sopra il limite di quantificazione in modo che più di un tempo di dimezzamento del carico corporeo può essere misurato nella fase di depurazione dello studio.

([2]) Cfr. appendice 1, Definizioni e unità di misura.

▼M7

insignificante. La concentrazione della sostanza in esame nel o sul pesce (o suo tessuto specificato) viene seguita in entrambe le fasi della prova. Oltre al gruppo di trattamento, un gruppo di controllo di pesci viene mantenuto in condizioni identiche ma senza esposizione alla sostanza in esame, per confrontare possibili effetti dannosi osservati nella prova di bioconcentrazione con un gruppo di controllo analogo e per ottenere la concentrazione di fondo della sostanza in esame ([1]).

Nella prova di esposizione in ambiente acquatico, la fase di assorbimento dura solitamente 28 giorni. Tale periodo può essere prolungato se necessario (cfr. paragrafo 18), o abbreviato qualora sia dimostrato che lo stato stazionario è stato raggiunto anticipatamente (cfr. appendice 1, Definizioni e unità di misura). È possibile prevedere la durata della fase di assorbimento e del tempo necessario al raggiungimento dello stato stazionano attraverso le equazioni di cui all'appendice 5. Inizia quindi la fase di depurazione, in cui i pesci non sono più esposti alla sostanza in esame: i pesci sono trasferiti in un mezzo identico, ma privo della sostanza in esame, contenuto in una vasca pulita. È preferibile, nella misura del possibile, calcolare il fattore di bioconcentrazione in due modi: da un lato il fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario (BCF_{SS}; cfr. appendice 1, Definizione), vale a dire il rapporto tra la concentrazione nel pesce (C_f) e la concentrazione nell'acqua (C_w); e, dall'altro, il fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_k; cfr. appendice 1, Definizioni e unità di misura), vale a dire il rapporto tra la costante cinetica di assorbimento (k_1) e la costante cinetica di depurazione (k_2) presupponendo una cinetica di primo ordine ([2]).

Se lo stato stazionario non è raggiunto dopo 28 giorni, occorre calcolare il BCF con il metodo cinetico (cfr. paragrafo 38) oppure si può prorogare la fase di assorbimento. Se il tempo necessario per raggiungere lo stato stazionario è troppo lungo nella pratica (cfr. paragrafi 37 e 38, appendice 5), l'approccio cinetico è preferibile. In alternativa, per le sostanze fortemente idrofobe si esaminerà la possibilità di effettuare la prova per via alimentare, a condizione che quest'ultima rispetti la normativa in vigore ([3]).

La costante cinetica di assorbimento, la costante cinetica di depurazione (perdita) (o le costanti, se sono applicati sistemi più complessi), il fattore di bioconcentrazione (allo stato stazionario e/o cinetico) e, se possibile, gli intervalli di confidenza di ciascuno di questi parametri vengono calcolati sulla base del modello che meglio descrive le concentrazioni misurate di sostanza in esame nel pesce e nell'acqua (cfr. appendice 5).

L'aumento della massa dei pesci durante la prova si tradurrà in una diminuzione della concentrazione della sostanza in esame nel pesce (effetto noto come «effetto di diluizione dovuto alla crescita), e pertanto il BCF cinetico sarà sottostimato se non corretto di conseguenza (cfr. paragrafi 72 e 73)».

Il BCF è calcolato in base alla concentrazione totale nel pesce (ossia in funzione della massa umida totale dei pesci). Tuttavia, per scopi speciali, se il pesce è sufficientemente grande o può venire diviso in parti commestibili (filetto) e non commestibili (viscere), si possono usare determinati tessuti o organi (per esempio muscolo, fegato). Poiché per molte sostanze organiche esiste una chiara relazione tra il potenziale di bioconcentrazione e l'idrofobia, esiste anche una relazione corrispondente tra il contenuto lipidico dei pesci in esame e il valore osservato di bioconcentrazione di tali sostanze. Pertanto, allo scopo di ridurre questa fonte

([1]) Per la maggior parte delle sostanze in esame, idealmente non si dovrebbe procedere ad alcun rilevamento nell'acqua di controllo. Le concentrazioni di fondo dovrebbero applicarsi solo ai materiali presenti in natura (ad esempio metalli) e alle sostanze largamente diffuse nell'ambiente.

([2]) Qualora sia evidente che non avviene una reazione di primo ordine, si devono impiegare modelli più complessi (cfr. bibliografia dell'appendice 5) con l'assistenza di un esperto di biostatistica.

([3]) L'assorbimento può essere limitato da una bassa concentrazione di esposizione a causa della scarsa solubilità in acqua nella prova di bioconcentrazione, mentre concentrazioni di esposizione molto maggiori possono essere ottenute nella prova con esposizione per via alimentare.

▼M7

di variabilità nei risultati sperimentali per le sostanze altamente lipofile (cioè con log K_{ow} > 3), la bioconcentrazione dovrebbe essere espressa in modo standardizzato per un pesce con un contenuto di grassi del 5 % (del peso corporeo totale), oltre alla bioconcentrazione ottenuta direttamente dalla prova. Ciò è necessario per comparare i risultati ottenuti da diverse sostanze e/o specie di prova. La percentuale del 5 % di tenore lipidico viene generalmente utilizzata, poiché ciò rappresenta di fatto il valore medio del contenuto di lipidi del pesce comunemente utilizzato nel presente metodo di prova (21).

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

Oltre alle proprietà della sostanza in esame elencate nell'introduzione (paragrafo 3), occorre conoscere anche la tossicità per le specie ittiche usate nella prova, preferibilmente la LC_{50} asintotica (cioè indipendente dal tempo) e/o la tossicità prevista durante le prove a lungo termine sui pesci [cfr. in particolare gli orientamenti dell'OCSE 210 (22), 212 (23), 215 (24)].

Occorre disporre di un metodo analitico di comprovata accuratezza, precisione e sensibilità, per la quantificazione della sostanza in esame nelle soluzioni di prova e nel materiale biologico, nonché le modalità per la preparazione e la conservazione dei campioni. Dovrebbe essere noto anche il limite analitico di quantificazione della sostanza di prova nell'acqua e nei tessuti del pesce. Se viene utilizzata una sostanza radiomarcata, essa dovrebbe essere della massima purezza (preferibilmente > 98 %) e la percentuale di radioattività associata alle impurità deve essere nota.

VALIDITÀ DELLA PROVA

Perché una prova sia valida devono essere soddisfatte le seguenti condizioni:

La variazione di temperatura dell'acqua è inferiore a ± 20 °C, in quanto grandi scostamenti possono influenzare i parametri biologici pertinenti per l'assorbimento e la depurazione, ma anche causare stress agli animali;

La concentrazione dell'ossigeno disciolto non scende al di sotto del 60 % della saturazione;

La concentrazione della sostanza in esame nelle vasche è mantenuta in un intervallo di ± 20 % intorno alla media dei valori misurati durante la fase di assorbimento;

La concentrazione della sostanza in esame è inferiore al limite di solubilità nell'acqua, tenendo conto dell'eventuale effetto dell'acqua di prova sulla solubilità reale ([1]);

La mortalità, le malattie o altri effetti nocivi nei pesci trattati e di controllo sono minori del 10 % al termine della prova. Se la prova dura alcune settimane o mesi, il tasso di mortalità o altri effetti dannosi in entrambi i gruppi di pesci deve essere minore del 5 % al mese e non superare il 30 % in totale. Differenze significative in termini di crescita media dei campioni del gruppo di prova e del gruppo di controllo potrebbero indicare un eventuale effetto tossico della sostanza in esame.

SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Sarebbe utile disporre di sostanze di riferimento di cui si conosce il potenziale di bioconcentrazione e il metabolismo ridotto per verificare la procedura sperimentale, se del caso (ad esempio se il laboratorio non ha precedenti esperienze con l'esecuzione di tale prova o quando le condizioni sperimentali sono state modificate).

([1]) Per le sostanze multicomponenti, le sostanze UVCB e le miscele, si deve prendere in considerazione la solubilità in acqua di ogni componente al fine di determinare le opportune concentrazioni di esposizione.

▼M7

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiatura

Occorre evitare l'impiego di materiali — in tutte le parti dell'apparecchiatura sperimentale — che possono essere soggetti a dissoluzione, assorbimento o lisciviatura e avere un effetto dannoso sul pesce. Possono essere utilizzate vasche convenzionali rettangolari o cilindriche di materiale chimicamente inerte e di capacità adeguata al tasso di carico (cfr. paragrafo 43). È opportuno minimizzare l'uso di tubi di materia plastica flessibile; è opportuno scegliere un tubo in teflon®, in acciaio inossidabile o in vetro. L'esperienza ha dimostrato che in presenza di sostanze in esame con elevati coefficienti di adsorbimento, quali i piretroidi sintetici, potrebbe essere necessario utilizzare il vetro silanizzato. In tal caso le apparecchiature non possono essere riutilizzate. È opportuno esporre i sistemi di esame alle concentrazioni adeguate della sostanza in esame per il tempo necessario a dimostrare il mantenimento della stabilità delle concentrazioni di esposizione prima dell'introduzione degli organismi di prova.

Acqua

Ai fini della prova si usa in genere acqua naturale che dovrebbe essere ottenuta da una fonte non contaminata e di qualità uniforme. Tuttavia, l'acqua ricostituita (acqua demineralizzata in cui specifici nutrienti sono stati aggiunti in quantità note) può essere più adatta per garantire una qualità uniforme nel tempo. La qualità dell'acqua di diluizione, vale a dire l'acqua mescolata con la sostanza in esame prima di essere inserita nel recipiente di prova (cfr. paragrafo 30), deve essere di una qualità che permetta la sopravvivenza delle specie ittiche scelte per la durata del periodo di acclimatazione e del periodo di prova senza che presentino anomalie sul piano del comportamento o dell'apparenza. L'ideale sarebbe dimostrare che la specie in esame è in grado di sopravvivere, crescere e riprodursi nell'acqua di diluizione (per esempio in una coltura di laboratorio o in un saggio di tossicità sull'intero ciclo di vita). L'acqua di diluizione deve essere caratterizzata almeno dal pH, la durezza, i solidi totali, il carbonio organico totale (TOC) ([1]) e di preferenza anche ammonio, nitriti e alcalinità nonché, per le specie marine, la salinità. I parametri che sono importanti ai fini del benessere dei pesci non sono perfettamente noti, ma l'appendice 2 fornisce concentrazioni massime raccomandate per un certo numero di parametri per le acque dolci e marine usate nella prova.

L'acqua di diluizione deve essere di qualità costante per tutta la durata della prova. Il pH deve essere compreso tra 6,0 e 8,5 all'inizio della prova, ma senza variare di oltre ± 0,5 unità di pH nel corso dell'esperimento. Al fine di garantire che l'acqua di diluizione non abbia influenze indesiderate sul risultato sperimentale (per esempio per complessazione della sostanza in esame) o influenze negative sulla performance dello stock di pesce, ad intervalli si dovrebbero prelevare campioni per analisi, almeno all'inizio e alla fine della prova. Occorre determinare i metalli pesanti (ad esempio Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), i principali anioni e cationi (ad es. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, e SO_4^{2-}), i pesticidi (ad esempio pesticidi organofosforati totali e organoclorurati totali), il carbonio organico totale e i solidi in sospensione, 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).

Il contenuto naturale di particelle in sospensione nonché di carbonio organico totale nell'acqua di diluizione deve essere il più basso possibile per evitare un assorbimento della sostanza in esame su materia organica, il che ridurrebbe la biodisponibilità e porterebbe a sottostimare il BCF. Il valore massimo accettabile è di 5 mg/l per i solidi sospesi (materia secca che non passa attraverso un filtro

([1]) Il TOC include il carbonio organico del particolato e il carbonio organico disciolto, TOC = POC + DOC.

▼M7

da 0,45 μm) e di 2 mg/l per il carbonio organico totale (cfr. appendice 2). Se necessario, filtrare l'acqua di diluizione prima dell'uso. È opportuno che il contributo degli escrementi dei pesci sottoposti a prova e dei residui alimentari al contenuto di carbonio organico dell'acqua di prova sia il minore possibile (cfr. paragrafo 46).

Soluzioni di prova

Preparare una soluzione madre della sostanza in esame alla concentrazione adeguata. La soluzione madre deve essere preparata preferibilmente per semplice miscelazione o agitazione della sostanza in esame nell'acqua di diluizione. Un'alternativa idonea, in alcuni casi, è l'utilizzo di un sistema di dosaggio del desorbimento in fase solida. L'utilizzo di solventi o disperdenti (agenti solubilizzanti) è generalmente sconsigliato (cfr. (25)); il loro uso può essere accettabile per ottenere una soluzione madre alla concentrazione adeguata, ma occorre adoperarsi per ridurre al minimo l'uso di tali materiali e non superare la loro concentrazione micellare critica (se del caso). I solventi che possono essere utilizzati sono acetone, etanolo, metanolo, dimetilformammide e glicole trietilenico; disperdenti utilizzati sono Tween 80, metilcellulosa 0,01 % e HCO-40. La concentrazione di solvente nel mezzo di prova finale deve essere identica in tutti i trattamenti (vale a dire indipendentemente dalla concentrazione della sostanza in esame) e non dovrebbe superare i limiti di tossicità del solvente determinata nelle condizioni sperimentali. La concentrazione massima è di 100 mg/l (o 0,1 ml/l). È improbabile che una concentrazione di solvente di 100 mg/l modifichi significativamente la concentrazione della sostanza in esame disciolta, ottenibile nel mezzo di prova (25). Il contributo del solvente (insieme con la sostanza in esame) al contenuto complessivo di carbonio organico nell'acqua usata per il saggio deve essere noto. Durante l'intera prova, la concentrazione del carbonio organico totale nei recipienti di prova non deve superare la concentrazione di carbonio organico derivata dalla sostanza in esame, solvente o agente solubilizzante, se usato, di più di 10 mg/l (± 20 %) ([1]). Il contenuto di materia organica può avere un effetto significativo sul volume della sostanza in esame disciolta liberamente durante le prove con metodo a flusso continuo, soprattutto per le sostanze chimiche fortemente lipofile. La microestrazione in fase solida (cfr. paragrafo 60) può fornire importanti informazioni sul rapporto tra composti disciolti liberi e vincolati, considerati come frazione biodisponibile. La concentrazione della sostanza in esame dovrebbe essere inferiore al limite di solubilità della sostanza in esame nel mezzo di prova nonostante l'uso di un solvente o solubilizzante. Occorre utilizzare con cautela i solventi facilmente biodegradabili, poiché potrebbero causare problemi di crescita batterica nelle prove a flusso continuo. Se non è possibile preparare una soluzione madre senza l'impiego di un agente di solubilizzazione, occorre valutare l'opportunità di eseguire una prova di esposizione in ambiente acquatico anziché una prova per via alimentare.

Per le prove a flusso continuo occorre un sistema che eroghi e diluisca in continuo una soluzione madre della sostanza in esame (ad esempio pompa dosatrice, diluitore proporzionale, sistema di saturazione) o un sistema di dosaggio del desorbimento in fase solida, per ottenere la concentrazione desiderata nelle vasche sperimentali. Preferibilmente rinnovare il volume almeno cinque volte al giorno in vasca sperimentale. La modalità a flusso continuo va preferita, ma laddove non sia possibile (per esempio se ciò danneggiasse gli organismi sperimentali) si può utilizzare una tecnica semistatica, purché siano rispettati i criteri di validità (cfr. paragrafo 24). Le portate di soluzione madre e acqua di diluizione devono essere controllate 48 ore prima della prova e poi almeno una volta al giorno durante la prova. Nel corso di tale verifica, determinare la portata attraverso ciascuna vasca sperimentale e assicurare che la variazione non superi il 20 % all'interno di ciascuna camera e tra una vasca e l'altra.

([1]) Pur non essendo generalmente raccomandati, se si utilizzano solventi o agenti solubilizzanti, il carbonio organico proveniente da tali agenti deve essere aggiunto al carbonio organico della sostanza in esame per valutare la concentrazione del carbonio organico nel recipiente di prova.

▼M7

Selezione della specie

Criteri importanti nella scelta delle specie sono la disponibilità, la possibilità di ottenerle di dimensioni adeguate e di mantenerle in modo soddisfacente in laboratorio. Altri criteri per la scelta delle specie ittiche includono un interesse ricreativo o commerciale, l'importanza ecologica nonché una sensibilità comparabile, utilizzi precedenti riusciti, ecc. Le specie sperimentali raccomandate sono indicate nell'appendice 3. Si possono usare anche altre specie, ma in tal caso la procedura di prova potrebbe dover essere adattata per ottenere condizioni sperimentali idonee. In tal caso occorre spiegare i criteri di scelta delle specie e del metodo sperimentale. In generale, l'uso di specie ittiche più piccole ridurrà il tempo di raggiungimento dello stato stazionario; tuttavia un numero maggiore di individui (campioni) sarà necessario per analizzare adeguatamente il contenuto lipidico e la concentrazione della sostanza in esame nel pesce. Inoltre, è possibile che le differenze di ritmo respiratorio e metabolismo tra pesci giovani e meno giovani possano ostacolare il raffronto dei risultati tra le diverse prove e le diverse specie. Si noti che eseguire la prova di tossicità sui pesci nelle prime fasi di vita (giovani) in rapida crescita, può rendere difficile l'interpretazione dei dati.

Mantenimento dei pesci (acqua e regime alimentare pertinenti per l'esposizione)

La popolazione ittica va acclimatata alle condizioni di laboratorio per almeno due settimane in acqua (cfr. paragrafo 28) alla temperatura di prova ed essere sufficientemente nutrita durante tutto il periodo (cfr. paragrafo 45). L'acqua e il regime alimentare devono essere dello stesso tipo di quelli destinati ad essere usati durante la prova.

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: respingere l'intero lotto;

— mortalità compresa tra il 5 e il 10 % della popolazione in sette giorni: l'acclimatazione prosegue per altri sette giorni — in caso di mortalità superiore al 5 % durante il secondo periodo di sette giorni l'intero lotto viene respinto;

— mortalità inferiore al 5 % della popolazione in sette giorni: accettare il lotto.

I pesci usati nelle prove devono essere esenti da malattie o anomalie osservabili. È necessario eliminare qualsiasi pesce ammalato. Durante le due settimane precedenti la prova e durante la prova i pesci non devono ricevere trattamenti per malattie.

ESECUZIONE DELLA PROVA

Prova preliminare

Può essere utile condurre un esperimento preliminare allo scopo di ottimizzare le condizioni sperimentali della prova definitiva, per esempio la scelta delle concentrazioni della sostanza in esame e la durata delle fasi di assorbimento e di depurazione o per determinare se è necessario eseguire una prova completa. La prova preliminare deve essere concepita in modo tale da ottenere le informazioni richieste. Si può valutare se una sperimentazione ridotta possa essere sufficiente per ottenere un fattore di bioconcentrazione o se sia necessario uno studio completo sulla prova (cfr. i paragrafi da 83 a 95 sulla sperimentazione ridotta).

Condizioni di esposizione

Durata della fase di assorbimento

La durata prevedibile della fase di assorbimento si può ricavare dall'esperienza pratica (per esempio da uno studio precedente o da un accumulo di studi su sostanze strutturalmente affini) o da certe relazioni empiriche, conoscendo la solubilità in acqua o il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua della sostanza in esame (a condizione che l'assorbimento segua una cinetica di primo ordine, cfr. appendice 5).

▼M7

La fase di assorbimento deve durare 28 giorni, salvo dimostrazione che è stato raggiunto prima lo stato stazionario (cfr. appendice 1, Definizioni e unità di misura). Il raggiungimento dello stato stazionario nel tracciato della sostanza in esame nei pesci (C_f) in funzione del tempo avviene quando la curva diventa parallela all'asse del tempo e tre analisi successive di C_f su campioni prelevati ad intervalli di almeno due giorni danno valori che si collocano entro ± 20 % uno dall'altro, e non vi è alcun aumento significativo di C_f nel periodo di tempo trascorso tra la prima e l'ultima analisi successive. Quando si analizzano campioni raggruppati, sono necessarie almeno quattro analisi successive. Per il controllo di sostanze che vengono assorbite lentamente saranno più opportuni intervalli di sette giorni. Se lo stato stazionario non viene raggiunto entro 28 giorni, il BCF è calcolato utilizzando solo l'approccio cinetico, che non dipende dal raggiungimento dello stato stazionario, oppure può essere prolungata la fase di assorbimento, effettuando ulteriori misure, fino al raggiungimento dello stato stazionario o fino al 60° giorno (a seconda di quale periodo sia più breve). Inoltre, la concentrazione della sostanza in esame nel pesce alla fine della fase di assorbimento deve essere sufficientemente elevata da consentire una stima attendibile della costante k_2 a partire dalla fase di depurazione. Se nessun assorbimento significativo è accertato dopo 28 giorni, la prova può essere interrotta.

Durata della fase di depurazione

Per le sostanze che seguono una cinetica di primo ordine, un periodo pari a metà della durata della fase di assorbimento è solitamente sufficiente perché si verifichi una riduzione appropriata (per esempio del 95 %) del carico corporeo della sostanza (cfr. appendice 5 per una spiegazione della stima). Se il periodo necessario per raggiungere una perdita del 95 % è eccessivamente lungo, per esempio se supera il doppio della normale durata della fase di assorbimento (cioè oltre 56 giorni), si può utilizzare un periodo più breve (ad esempio, fino a che la concentrazione della sostanza in esame sia inferiore al 10 % della concentrazione allo stato stazionario). Tuttavia, possono essere necessari periodi di depurazione più lunghi per le sostanze che hanno caratteristiche di assorbimento e depurazione più complesse di quelle rappresentate da un modello ittico a compartimento singolo che segue una cinetica di primo ordine. Se si osservano o si prevedono tali fenomeni complessi, si consiglia di ricorrere all'assistenza di un esperto in biostatistica e/o farmacocinetica per garantire una corretta configurazione della prova. Se la fase di depurazione è prorogata, il numero di pesci da prelevare può diventare un ostacolo e le differenze nella crescita dei pesci possono influenzare i risultati. Il periodo dipenderà inoltre dal periodo durante il quale la concentrazione della sostanza in esame nel pesce rimane al di sopra del limite analitico di quantificazione.

Numero di pesci di prova

Scegliere il numero di pesci per ogni concentrazione di prova in modo da includere almeno quattro pesci per ciascun tempo di campionamento. I pesci sono raggruppati solo se non sia possibile l'analisi di un unico pesce. Se è richiesta una maggiore precisione nell'adattamento della curva (e nei parametri derivati) o se sono necessari gli studi sul metabolismo (ad esempio per distinguere tra i metaboliti e la sostanza madre quando si utilizzano sostanze radiomarcate), è necessario un maggior numero di pesci per punto di campionamento. Il contenuto di lipidi deve essere determinato possibilmente sullo stesso materiale biologico usato per determinare la concentrazione della sostanza in esame. Se ciò non fosse possibile, possono essere necessari ulteriori pesci (cfr. paragrafi 56 e 57).

Se si usano pesci adulti (cioè sessualmente maturi), essi non dovrebbero essere in stato di riproduzione o non essersi riprodotti di recente, sia prima che durante la prova. Occorre anche precisare il sesso dei pesci utilizzati. Se si utilizzano pesci di entrambi i sessi, occorre documentare che non vi sono differenze significative tra i sessi in termini di crescita e di contenuto lipidico prima dell'inizio dell'esposizione, in particolare se è previsto che sarà necessaria la messa in comune dei pesci maschi e femmine per ottenere concentrazioni rilevabili della sostanza e/o del contenuto di lipidi.

▼M7

In tutte le prove è necessario scegliere pesci di peso simile, tale che il più piccolo abbia dimensioni non inferiori a due terzi del peso dei più grandi. I pesci dovrebbero essere tutti della stessa classe di età e avere la medesima provenienza. Poiché il peso e l'età di un pesce possono avere un effetto significativo sui valori del BCF (12), tali indicazioni devono essere registrate con precisione. Si raccomanda di pesare un sottocampione dello stock di pesce subito prima dell'inizio della prova per stimare il peso medio (cfr. paragrafo 61).

Carico

Usare elevati rapporti acqua/pesce per minimizzare la riduzione nella concentrazione della sostanza in esame nell'acqua derivante dall'aggiunta del pesce all'inizio della prova e per evitare riduzioni della concentrazione dell'ossigeno disciolto. È importante che il carico sia appropriato per la specie usata nella prova. In ogni caso si raccomanda normalmente un tasso di carico pesce/acqua di 0,1-1,0 g di pesce (peso umido) per litro d'acqua per giorno. Si possono utilizzare carichi pesce/acqua più elevati se si dimostra che la concentrazione della sostanza in esame non registra una variazione superiore a ± 20 %, e che la concentrazione dell'ossigeno disciolto non scende al di sotto del 60 % della saturazione (cfr. paragrafo 24).

Nella scelta di appropriati regimi di carico si deve tener conto dell'habitat normale della specie ittica. Per esempio, le specie bentoniche, a parità di volume d'acqua, possono richiedere un acquario con area di base maggiore rispetto a quello destinato alle specie ittiche pelagiche.

Alimentazione

Durante i periodi di acclimatazione e di prova, occorre mantenere i pesci ad un regime alimentare appropriato, con un contenuto totale di lipidi e di proteine noto, in quantità sufficiente per mantenerli in buone condizioni di salute e mantenere costante il peso corporeo (è tollerata una certa crescita). Per tutto il periodo di acclimatazione e di prova somministrare ai pesci il cibo in una quantità fissa in funzione della specie utilizzata, alle medesime condizioni sperimentali e di un valore energetico stabile (ad esempio, per la trota iridea approssimativamente dall'1 % al 2 % del peso corporeo al giorno). La razione alimentare è definita in modo da evitare un rapido sviluppo e un forte aumento del tenore di grassi. La quantità di cibo somministrato deve venire ricalcolata ad intervalli appropriati, per esempio una volta alla settimana, per mantenere costanti il peso corporeo e il contenuto di lipidi. Per questo calcolo, si può stimare il peso dei pesci in ciascuna vasca sperimentale in base al peso del pesce campionato più recentemente nella stessa vasca. Non pesare i pesci rimasti nella vasca.

Cibo non consumato e feci vanno sifonati giornalmente dalle vasche sperimentali poco dopo la somministrazione del cibo (da 30 minuti a 1 ora). Mantenere vasche più pulite possibile per l'intera prova in modo che la concentrazione di materia organica rimanga per quanto possibile scarsa (cfr. paragrafo 29) perché la presenza di carbonio organico può limitare la biodisponibilità della sostanza in esame (12).

Poiché molti mangimi derivano da farina di pesce, occorre assicurarsi che il mangime non influenzi i risultati della prova o induca effetti nocivi, ad esempio se contiene (tracce di) pesticidi, metalli pesanti e /o la stessa sostanza in esame.

Illuminazione e temperatura

Si raccomanda un fotoperiodo di 12-16 ore e la temperatura dell'acqua (± 2 °C) deve essere adatta alla specie utilizzata (appendice 3). Il tipo e le caratteristiche dell'illuminazione devono essere noti. Fare attenzione ad una possibile fototrasformazione della sostanza in esame alle condizioni di irraggiamento dello studio. Usare un'illuminazione appropriata evitando l'esposizione del pesce a fotoprodotti non naturali. In alcuni casi può essere appropriato utilizzare un filtro per bloccare la radiazione UV al di sotto di 290 nm.

▼M7

Concentrazioni della sostanza in esame

Questa prova è stata inizialmente concepita per le sostanze organiche non polari. Per questo tipo di sostanza, l'esposizione del pesce a una concentrazione unica dovrebbe essere sufficiente, poiché non sono previsti effetti di concentrazione, benché il quadro normativo in vigore possa richiedere due concentrazioni. Se si saggiano altri tipi di sostanze, o se vi sono altre indicazioni di dipendenza della concentrazione, la prova deve essere effettuata con due o più concentrazioni. Se viene saggiata una sola concentrazione, occorre giustificare la scelta della concentrazione (cfr. paragrafo 79). Inoltre, la concentrazione deve essere la più bassa possibile o tecnicamente possibile (cioè non vicino al limite di solubilità).

In alcuni casi si può prevedere che la bioconcentrazione di una sostanza dipenda dalla concentrazione dell'acqua (ad esempio per i metalli, per i quali l'assorbimento da parte dei pesci può essere almeno in parte regolato). In tal caso può essere necessario analizzare almeno due, e possibilmente più (cfr. paragrafo 49), concentrazioni rilevanti per l'ambiente. Inoltre per le sostanze per le quali le concentrazioni devono, per ragioni pratiche, essere vicine al limite di solubilità, si raccomanda di analizzare almeno due concentrazioni, il che può dare un'idea dell'affidabilità delle concentrazioni di esposizione. Tra le concentrazioni di prova figurano la concentrazione dell'ambiente reale, nonché la concentrazione pertinente per l'argomento specifico della valutazione.

La o le concentrazioni della sostanza in esame devono essere inferiori al livello al quale producono effetti cronici o all'1 % della concentrazione LC_{50} acuta asintotica all'interno di un intervallo di interesse ambientale e superiori di almeno un ordine di grandezza al limite di quantificazione in acqua mediante il metodo analitico utilizzato. Il valore massimo ammissibile di concentrazione di prova può essere determinato anche dividendo la LC_{50} acuta (96 h) per un appropriato rapporto di concentrazione acuta/cronica (rapporti appropriati per alcuni prodotti chimici si situano intorno a 3, ma alcuni sono oltre 100). Se è utilizzata una seconda concentrazione, essa non deve differire dalla prima di un fattore dieci. Se ciò non è possibile in base al criterio di tossicità (che fissa un limite massimo per la concentrazione di prova) e al limite inferiore di determinazione analitica è opportuno applicare un fattore inferiore a 10 e utilizzare una sostanza radiomarcata, (della purezza più elevata, di preferenza superiore al 98 %). Occorre provvedere a che la concentrazione della sostanza in esame non superi la solubilità nel mezzo di prova.

Controlli

In aggiunta alle concentrazioni con la sostanza di prova, dovrebbe essere allestita una serie di controllo con l'acqua di diluizione o, se del caso, una serie di controllo contenente il solvente.

Frequenza delle misurazioni della qualità dell'acqua

Durante la prova, misurare l'ossigeno disciolto, il carbonio organico totale, il pH e la temperatura in tutte le vasche di prova e di controllo. La durezza totale e la salinità (se del caso) vanno misurate almeno nelle vasche di controllo e in una vasca di prova. Se due o più concentrazioni sono sottoposte a prova, misurare tali parametri alla concentrazione massima. Come minimo, l'ossigeno disciolto e, se del caso, la salinità devono essere misurati tre volte — all'inizio, verso la metà e alla fine del periodo di assorbimento — e una volta alla settimana durante il periodo di depurazione. Il TOC deve essere misurato all'inizio del saggio (24 h e 48 h prima dell'inizio della fase di assorbimento), prima dell'aggiunta del pesce e almeno una volta la settimana durante le fasi di assorbimento e depurazione. La temperatura va misurata e registrata giornalmente, il pH all'inizio e al termine di ciascun periodo e la durezza una volta per ogni prova. La temperatura dovrebbe preferibilmente essere controllata in continuo in almeno una vasca.

▼M7

Campionamento e analisi dei pesci e dell'acqua

Programma di campionamento del pesce e dell'acqua

Per la determinazione della concentrazione della sostanza in esame, l'acqua delle vasche sperimentali deve essere campionata prima dell'aggiunta del pesce e durante le fasi di assorbimento e depurazione. L'acqua deve essere campionata contemporaneamente al campionamento del pesce e prima della somministrazione di cibo. Campionamenti più frequenti possono essere utili per garantire la stabilità delle concentrazioni dopo l'introduzione dei pesci. Occorre determinare le concentrazioni della sostanza in esame durante la fase di assorbimento al fine di verificare il rispetto dei criteri di validità (paragrafo 24). Se l'analisi dell'acqua prelevata all'inizio della fase di depurazione non rileva alcuna sostanza in esame, ciò potrebbe giustificare la sospensione della verifica della presenza di tale sostanza nell'acqua di prova e acqua di controllo per il resto della fase di eliminazione.

I pesci devono essere campionati almeno cinque volte durante la fase di assorbimento e almeno quattro volte durante la fase di depurazione per rilevare la sostanza in esame. Poiché in qualche caso risulterà difficile calcolare una stima ragionevolmente precisa del BCF sulla base di questo numero di campioni, in particolare quando la cinetica di depurazione non è una semplice cinetica di primo ordine, è consigliabile prelevare campioni a frequenza più elevata in tutti e due i periodi (cfr. appendice 4).

Il contenuto di lipidi e la concentrazione della sostanza in esame sono determinati sullo stesso materiale biologico almeno all'inizio e alla fine della fase di assorbimento e alla fine della fase di depurazione. Qualora ciò non fosse possibile, almeno tre esemplari dovranno essere campionati indipendentemente per determinare il contenuto lipidico in ciascuno dei medesimi tre punti di campionamento. Il numero di pesci per vasca all'inizio dell'esperimento dovrebbe essere adeguato di conseguenza ([1]). In alternativa, se non sono rilevate quantità significative della sostanza in esame nei pesci di controllo (cioè i pesci dello stock di popolazione), i pesci di controllo della prova possono essere analizzati soltanto per il loro contenuto lipidico e l'analisi della sostanza in esame nel o nei gruppi di prova (nonché la costante cinetica di assorbimento, la costante cinetica di depurazione e valori del BCF) può essere corretta in funzione del contenuto lipidico del gruppo di controllo durante la prova ([2]).

Gli esemplari morti o malati non devono essere esaminati per la sostanza in esame o concentrazione lipidica.

L'appendice 4 presenta un esempio di un programma di campionamento accettabile. Si possono facilmente calcolare altri programmi se si usano altri valori di K_{ow} per calcolare il tempo di esposizione necessario per un assorbimento del 95 % (cfr. appendice 5).

Il campionamento va proseguito durante la fase di assorbimento fino al raggiungimento dello stato stazionario (cfr. appendice 1, Definizioni e unità di misure) o una volta terminata la fase di assorbimento (dopo 28 o 60 giorni, cfr. paragrafi 37 e 38). Prima dell'inizio della fase di depurazione, i pesci devono essere trasferiti in contenitori puliti.

Campionamento e preparazione del campione

I campioni d'acqua per l'analisi vengono ottenuti, per esempio, mediante sifonatura attraverso tubature inerti da un punto centrale della vasca sperimentale. Né la filtrazione né la centrifugazione sembrano separare sempre la frazione non-biodisponibile della sostanza in esame da quella biodisponibile. Nel caso si ricorra a una separazione, occorre giustificare tale tecnica o fornirne una validazione nel verbale di prova, tenuto conto delle difficoltà di biodisponibilità (25). In particolare le sostanze fortemente idrofobe (ossia le sostanze il cui log K_{ow} > 5) (12) (26), per le quali può verificarsi un adsorbimento alla matrice del filtro o ai

([1]) Se il tenore di lipidi e la sostanza in esame non sono analizzati nello stesso pesce, i pesci devono almeno avere peso analogo ed essere (se del caso) dello stesso sesso.

([2]) Questa alternativa è valida solo se i pesci in tutti i gruppi di prova sono mantenute in gruppi con dimensioni analoghe, i pesci sono rimossi secondo lo stesso modello e alimentati allo stesso modo. Ciò garantisce che una crescita analoga dei pesci in tutti i gruppi di prova, se la concentrazione è inferiore all'intervallo di tossicità. Se il tasso di crescita è simile, anche il contenuto lipidico dovrebbe essere simile. Una crescita diversa nel gruppo di controllo può indicare un effetto della sostanza e vanificherebbe lo studio.

▼M7

recipienti di centrifugazione, non sono soggette a tali trattamenti. Vanno, invece, adottate le misure atte a mantenere le vasche più pulite possibile (cfr. paragrafo 46) e controllare il contenuto di carbonio organico totale durante le fasi di assorbimento e depurazione (cfr. paragrafo 53). Per evitare i problemi dovuti alla riduzione della biodisponibilità, si possono eseguire, per le sostanze scarsamente solubili e fortemente idrofobe, campionamenti mediante tecniche di microestrazione in fase solida.

I pesci campionati devono essere soppressi immediatamente con metodi non cruenti, utilizzando il metodo più appropriato e meno crudele (per i pesci interi, procedendo unicamente a risciacquarli in acqua (cfr. paragrafo 28) e asciugarli tamponando con carta assorbente). Pesare e misurare la lunghezza totale ([1]). Per ogni singolo pesce, il peso e la lunghezza misurati sono correlati alla concentrazione chimica esaminata (e se del caso al contenuto di grassi), ad esempio assegnando un codice di identificazione univoco per ciascun pesce.

È preferibile analizzare il pesce e l'acqua immediatamente dopo il campionamento allo scopo di evitare degradazione o altre perdite e calcolare costanti approssimative della velocità di assorbimento e depurazione nel corso della prova. L'analisi immediata consente inoltre di individuare rapidamente l'inizio di una fase di stato stazionario.

In mancanza di un'analisi immediata, tutti i campioni vanno conservati con un metodo appropriato. Prima di iniziare lo studio è opportuno ottenere informazioni sul metodo appropriato di conservazione della particolare sostanza in esame — ad esempio il congelamento, la conservazione a 4 °C, l'estrazione ecc. La durata della conservazione va scelta in modo da garantire che la sostanza non si degradi durante la stessa.

Qualità del metodo analitico

Poiché tutta la procedura è basata sostanzialmente sull'accuratezza, la precisione e la sensibilità del metodo analitico utilizzato per la sostanza in esame, controllare sperimentalmente che l'accuratezza, la precisione e la riproducibilità dell'analisi della sostanza, nonché il recupero della sostanza in esame dall'acqua e dal pesce, siano soddisfacenti per quel particolare metodo. Tali verifiche si effettuano nel corso delle prove preliminari. Occorre inoltre controllare che la sostanza in esame non sia rilevabile nell'acqua di diluizione usata. Se necessario, correggere i valori di concentrazione della sostanza in esame nell'acqua e nei pesci in funzione dei valori ottenuti nella prova per il recupero della sostanza in esame e la sua concentrazione naturale nei controlli. Manipolare sempre i campioni di pesce e acqua in modo da minimizzare la contaminazione e le perdite (per esempio per assorbimento sul dispositivo di campionamento).

Analisi dei campioni di pesce

Se nella prova vengono usati materiali radiomarcati, è possibile analizzare il marcatore radioattivo totale (cioè progenitore e metaboliti), oppure i campioni possono venire depurati, così da poter analizzare la sostanza madre separatamente. Se il BCF deve basarsi sulla sostanza madre, i principali metaboliti sono caratterizzati, almeno alla fine della fase di assorbimento (cfr. paragrafo 6). I principali metaboliti sono quelli che rappresentano almeno ≥ 10 % dei residui totali nei tessuti del pesce, quelli che rappresentano ≥ 5 % in due tempi consecutivi di campionamento, che aumentano i livelli durante la fase di assorbimento, infine, quelli di rilevanza tossicologica. Se il BCF per l'intero pesce in termini di residui totali con marcatura radioattiva è ≥ 500, può essere consigliabile, anche fortemente raccomandato nel caso di talune categorie di sostanze chimiche come i pesticidi, individuare e quantificare i principali metaboliti. La quantificazione di

([1]) Oltre al peso, va registrata la lunghezza totale perché il confronto tra le entità di aumento della lunghezza durante la prova è un buon indicatore per stabilire se si sia verificato un effetto negativo.

▼M7

tali metaboliti può essere richiesta da alcune autorità di regolamentazione. Se si identificano e quantificano prodotti di degradazione che rappresentano ≥ 10 % dei residui totali con marcatura radioattiva nei tessuti del pesce, si raccomanda di identificarli e quantificarli anche nell'acqua di prova. Se ciò non fosse possibile, va spiegato nella relazione.

La concentrazione della sostanza in esame viene di solito determinata su ciascun pesce pesato. Se ciò non è possibile, si possono raggruppare i campioni in occasione di ciascun campionamento, ma, poiché tale operazione limita il trattamento statistico dei risultati, è pertanto opportuno includere un numero sufficiente di pesci nella prova per tener conto del raggruppamento, della procedura statistica e della potenza desiderati. I riferimenti (27) e (28) possono essere utilizzati per l'introduzione alle pertinenti procedure di raggruppamento dei campioni.

Il BCF va espresso in modo normalizzato in funzione di un pesce con un contenuto di grassi del 5 % (in relazione al peso umido) in aggiunta al BCF ottenuto direttamente dalla prova (cfr. paragrafo 21), a meno che non si possa dimostrare che la sostanza in esame non si accumula principalmente nei grassi Occorre, se possibile, determinare il contenuto lipidico dei pesci a ciascun campionamento, di preferenza a partire dallo stesso estratto prodotto per l'analisi della sostanza in esame, perché i lipidi devono spesso venire rimossi dall'estratto prima di poterlo analizzare per via cromatografica. Tuttavia, l'analisi delle sostanze in esame richiede spesso specifiche procedure di estrazione che potrebbero essere in contraddizione con i metodi di prova per la determinazione dei lipidi. In questo caso (finché non siano disponibili idonei metodi strumentali non distruttivi), si raccomanda di impiegare una strategia differente per determinare il contenuto di lipidi del pesce (cfr. paragrafo 56). Si devono usare metodi adatti per la determinazione del contenuto lipidico (20). Si raccomanda la tecnica di estrazione cloroformio/metanolo (29) come metodo standard (30), ma anche il metodo Smedes (31) può essere utilizzato in alternativa. Quest'ultimo metodo è caratterizzato da efficienza di estrazione, alta precisione, uso di solventi organici meno tossici e facilità di esecuzione. Altri metodi di precisione comparabili ai metodi raccomandati potrebbero essere utilizzati a condizione di giustificarne adeguatamente la scelta. È importante fornire informazioni dettagliate sulla metodologia applicata.

Misurazione della crescita dei pesci

All'inizio della prova, pesare individualmente e misurare la lunghezza di 5-10 pesci dello stock. Può trattarsi degli stessi pesci utilizzati per l'analisi dei lipidi (cfr. paragrafo 56). Misurare il peso e la lunghezza dei pesci appartenenti ai gruppi di controllo e di prova utilizzati per ogni campionamento prima di procedere all'analisi chimica o dei lipidi. La misurazione di questi pesci campionati può essere usata per calcolare il peso e la lunghezza dei pesci rimasti nelle vasche di prova e di controllo (cfr. paragrafo 45).

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

La curva di assorbimento della sostanza in esame è ottenuta riportando graficamente la sua concentrazione nel/sul pesce (o tessuti specificati) durante la fase di assorbimento in funzione del tempo su scale aritmetiche. Se la curva ha raggiunto un andamento costante, cioè è diventata approssimativamente asintotica rispetto all'asse del tempo, il fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario (BCF_{SS}) è calcolato secondo la formula seguente:

$$\frac{C_f \text{allo stato stazionario} (media)}{C_w \text{allo stato stazionario} (media)}$$

▼M7

Lo sviluppo di C_f può essere influenzato dalla crescita dei pesci (cfr. paragrafi 72 e 73). La concentrazione media di esposizione (C_w) è influenzata da variazioni nel tempo. Si può prevedere che una concentrazione media ponderata nel tempo sia più pertinente e precisa per studi di bioaccumulo, anche se la variazione si mantiene all'interno del pertinente intervallo di validità (cfr. paragrafo 24). La media ponderata per il tempo della concentrazione in acqua può essere calcolata seguendo le istruzioni di cui all'appendice 5, sezione 1.

Il fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_k) è determinato come il rapporto k_1/k_2, le due costanti cinetiche di primo ordine. Le costanti cinetiche k_1 e k_2 e il BCF_k possono essere ottenuti adattando simultaneamente la fase di assorbimento e quella di depurazione. Un'altra soluzione consiste nel determinare k_1 e k_2 in sequenza (cfr. l'appendice 5 per una descrizione e un raffronto di questi metodi). La costante cinetica di depurazione (k_2) può essere corretta dall'effetto di diluizione dovuta alla crescita (cfr. paragrafi 72 e 73). Se è evidente che la curva di assorbimento e/o depurazione non è di primo ordine, bisogna allora impiegare modelli più complessi (cfr. bibliografia dell'appendice 5) con l'assistenza di un esperto in biostatistica e/o farmacocinetica.

Dati relativi al peso/alla lunghezza dei pesci

Il peso umido e la lunghezza totale di ogni esemplare, a ciascun tempo di campionamento, sono riportati separatamente per i gruppi di prova e di controllo durante le fasi di assorbimento e di depurazione (compreso lo stock ittico all'inizio del periodo di assorbimento). Per ogni singolo pesce, il peso e la lunghezza sono collegati alla concentrazione chimica analizzata, ad esempio dotando ciascun pesce di un codice d'identificazione univoco. Il peso è il parametro più indicato per la misurazione della crescita al fine di correggere i valori del BCF cinetico dall'effetto di diluizione dovuta alla crescita. Il paragrafo 73 e l'appendice 5 presentano il metodo utilizzato per la correzione dall'effetto di diluizione dovuta alla crescita.

Correzione dall'effetto di diluizione dovuta alla crescita e normalizzazione dei lipidi

La crescita del pesce durante la fase di depurazione può ridurre le concentrazioni della sostanza chimica misurate nel pesce, con la conseguenza che, nel complesso, la costante cinetica di depurazione (k_2) è di fatto maggiore rispetto a quanto si otterrebbe dai soli processi di depurazione (ad esempio respirazione, metabolismo, egestione). I fattori di bioconcentrazione cinetici sono corretti dall'effetto di diluizione dovuta alla crescita. Il BCF_{SS} è influenzato anche dalla crescita, ma non esiste una procedura di correzione concordata in materia In caso di forte crescita, deve essere calcolato anche il BCF_k, corretto dall'effetto della crescita (BCF_{kg}), perché può risultare più pertinente del fattore di bioconcentrazione. Il contenuto di liquidi nel pesce sottoposto a trattamento (fortemente associato al bioaccumulo delle sostanze idrofobe) può variare sufficientemente in pratica perché sia necessaria la normalizzazione sulla base di un tasso di lipidi predefinito (5 % del peso umido) al fine di ottenere significativi fattori di bioconcentrazione cinetico e allo stato stazionario — a meno che non sia possibile dimostrare che la sostanza non si accumula principalmente nei grassi (ad esempio alcune sostanze perfluorurate possono legarsi alle proteine). Le equazioni ed esempi per questi calcoli figurano nell'appendice 5.

Per correggere un BCF cinetico dall'effetto di diluizione dovuta alla crescita, la costante cinetica di depurazione deve essere corretta per la crescita. La costante cinetica di depurazione corretta per la crescita (k_{2g}) è calcolata sottraendo il tasso di crescita costante (k_g, ricavato dai dati relativi al peso misurato) dalla complessiva costante cinetica di depurazione (k_2). Il fattore di bioconcentrazione cinetico corretto per la crescita è calcolato dividendo la costante cinetica di assorbimento (k_1), la costante cinetica di depurazione corretta per la crescita (k_{2g}) (cfr. appendice 5). In alcuni casi questo metodo è inadeguato. Ad esempio, per sostanze a depurazione molto lenta saggiate in pesci in rapida crescita, il k_2g derivato può essere molto piccolo e quindi l'errore nelle due costanti cinetiche utilizzate per determinarlo è cruciale, e in alcuni casi le stime di kg possono

▼M7

essere superiori a k_2. Un approccio alternativo che evita la necessità di correzione dall'effetto di diluizione dovuto alla crescita comporta l'utilizzo dei dati di depurazione relativi alla massa della sostanza in esame per pesce (pesci interi), invece dei dati (concentrazione) relativi alla massa normale della sostanza in esame per unità di massa del pesce. Tale calcolo è facilmente ottenibile dato che le prove eseguite conformemente al presente metodo di prova dovrebbero collegare le concentrazioni registrate di tessuto al peso dei singoli pesci. La semplice procedura da seguire è descritta nell'appendice 5. Si noti che k_2 deve essere comunque registrato, anche se si applica questo metodo alternativo.

I fattori di bioconcentrazione cinetico e allo stato stazionario vanno registrati anche rispetto ad un contenuto standard di lipidi del pesce (5 % p/p), a meno che si possa sostenere che la sostanza in esame non si accumula principalmente nei grassi. I dati relativi alla concentrazione nel pesce, o il BCF, sono normalizzati in base al rapporto tra il 5 % e l'effettivo contenuto (individuale) di lipidi (in % di peso umido) (cfr. appendice 5).

Se l'analisi chimica e l'analisi dei lipidi sono state condotte sullo stesso pesce, si devono utilizzare i dati normalizzati relativi ai lipidi del singolo pesce ai fini del calcolo del BCF normalizzato in funzione dei lipidi. In alternativa, se il tasso di crescita è simile nei gruppi esposti e dei gruppi di controllo, si può utilizzare soltanto il contenuto lipidico dei pesci di controllo per la correzione dei lipidi (cfr. paragrafo 56). Un metodo di calcolo del BCF normalizzato è descritto nell'appendice 5.

Interpretazione dei risultati

Se le concentrazioni misurate delle soluzioni di prova sono prossime al limite di rilevazione del metodo analitico, i risultati devono essere interpretati con cautela.

Per escludere effetti tossici, in linea di principio la crescita media sia del gruppo di prova sia del gruppo di controllo non dovrebbe essere significativamente diversa. Le costanti del tasso di crescita o le curve di crescita dei due gruppi vanno confrontate mediante appropriata procedura ([1]).

Curve di assorbimento e depurazione chiaramente definite sono un'indicazione della buona qualità dei dati di bioconcentrazione. Per le costanti cinetiche, il risultato del test della bontà di adattamento χ^2 dovrebbe mostrare un buon adattamento (ossia una bassa percentuale di errore nelle misurazioni (32)) per il modello di bioaccumulo, affinché le costanti cinetiche possano essere considerate attendibili (cfr. appendice 5). Se si utilizza più di una concentrazione di prova, la variazione nelle costanti di assorbimento/depurazione tra le concentrazioni di prova deve essere minore del 20 % ([2]). In caso contrario, ciò potrebbe indicare una dipendenza dalla concentrazione. Se si osservano differenze significative nelle velocità di assorbimento/depurazione tra le concentrazioni di prova applicate, registrarle e fornire una possibile spiegazione. In generale, un intervallo di confidenza al 95 % del BCF negli studi ben impostati è vicino a ± 20 % del BCF ottenuto.

Se si saggiano due o più concentrazioni, i risultati di entrambe o tutte le concentrazioni sono utilizzati per esaminare la coerenza dei risultati e per mettere in evidenza un'eventuale dipendenza dalla concentrazione. Se si utilizza una sola

([1]) Può essere effettuato un test t sulle costanti del tasso di crescita, per verificare se la crescita varia tra gruppi di controllo e di prova, o un test F nel caso di analisi della varianza. Se necessario, un test F o del rapporto di verosimiglianza può essere utilizzato come ausilio per la scelta del modello di crescita (monografia 54 dell'OCSE (32).

([2]) Tali percentuali presuppongono che i metodi analitici sono affidabili e che il tempo di dimezzamento è < 14 giorni. Se i metodi d'analisi sono meno affidabili o il dimezzamento è (molto) maggiore questi numeri saranno più elevati.

▼M7

concentrazione per ridurre il numero di animali e/o le risorse impiegate, occorre giustificare tale scelta.

Il BCF_{SS} è incerto se il BCF_k è significativamente più grande del BCF_{SS}, poiché ciò può indicare che lo stato stazionario non è stato raggiunto o che la diluizione dovuta alla crescita e i processi di perdita non sono stati presi in considerazione. Nei casi in cui il BCF_{SS} è molto più elevato del BCF_k, è necessario verificare la presenza di possibili errori e calcolare nuovamente le costanti cinetiche di assorbimento e depurazione. Una diversa procedura di adattamento potrebbe migliorare la stima del BCF_k (cfr. appendice 5).

Relazione sulla prova

Oltre alle informazioni di cui al paragrafo 3, la relazione comprende i dati seguenti:

Sostanza in esame:

Natura fisica e, se del caso, proprietà fisicochimiche

— identità chimica, ad esempio nome CAS/IUPAC, numero CAS, codice MILES or InChI, formula di struttura, purezza, identità chimica delle impurità se possibile e fattibile in pratica, ecc. (compreso il contenuto di carbonio organico, se del caso).

— Per sostanze multi-componenti e UVCB (sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici) occorre descrivere con la massima precisione possibile l'identità chimica dei diversi componenti e individuare per ciascuno quale percentuale della massa totale della sostanza rappresenta. Spiegare brevemente in che modo il metodo analitico utilizzato consente di misurare la concentrazione della sostanza, e descrivere tutte le procedure di valutazione, indicando in particolare il grado di precisione del metodo, il limite di rilevabilità e il limite di quantificazione.

— Nel caso di sostanza radiomarcata, la posizione precisa dell'atomo o degli atomi marcati e la percentuale di radioattività associata ad impurezze.

— Informazioni sulla tossicità della sostanza in esame per il pesce (idealmente la specie utilizzata). La tossicità è riportata sotto forma di LC_{50} acuta (96 h) e NOAEL e LOAEL tratti da uno studio cronico (ad esempio, un test eseguito nelle prime fasi di vita o un test sull'intero ciclo di vita, se disponibile).

— Le condizioni di conservazione del prodotto o della sostanza chimica in esame e, se del caso, stabilità dello stesso in condizioni di conservazione, se ciò avviene prima dell'utilizzo.

Specie sperimentali:

Nome scientifico, ceppo, provenienza, eventuali pretrattamenti, acclimatazione, età, sesso (se del caso), dimensioni, peso e lunghezza, ecc.)

Condizioni sperimentali:

— Procedura di saggio usata (per esempio a flusso continuo o semistatica); studio completo o ridotto (compresi criteri e giustificazione).

— Tipo e caratteristiche dell'illuminazione usata e fotoperiodi.

— Disegno sperimentale (ad esempio numero e dimensioni delle vasche sperimentali, tasso di sostituzione del volume d'acqua, tasso di carico, numero di repliche, numero di pesci per campione, numero delle concentrazioni di prova, durata delle fasi di assorbimento e depurazione, frequenza di campionamento per i campioni di pesce e di acqua).

▼M7

— Metodo di preparazione delle soluzioni madre e frequenza di rinnovo (indicare il solvente, la sua concentrazione e il suo contributo al contenuto di carbonio organico dell'acqua) o descrizione del sistema di somministrazione alternativo.

— Concentrazioni nominali nella prova, medie dei valori misurati e loro deviazioni standard nelle vasche di saggio, e metodo e frequenza con cui sono ottenuti questi valori.

— Origine dell'acqua di diluizione, descrizione degli eventuali pretrattamenti, risultati di eventuali dimostrazioni della capacità del pesce sperimentale di vivere nell'acqua, e caratteristiche dell'acqua: pH, durezza, temperatura, concentrazione di ossigeno disciolto, livelli di cloro residuo (se misurati), carbonio organico totale, solidi sospesi, salinità del mezzo di prova (se misurato) ed eventuali altre misurazioni effettuate.

— Qualità dell'acqua all'interno delle vasche sperimentali, pH, durezza, TOC, temperatura e concentrazione dell'ossigeno disciolto; modalità e frequenza delle misurazioni.

— Informazioni dettagliate sull'alimentazione (ad esempio tipo/i di mangime, origine, composizione (se possibile indicare almeno il tenore lipidico e proteico), tasso di alimentazione selezionato, quantità somministrata e frequenza;

— Informazioni sul trattamento dei campioni di pesce e d'acqua, inclusi dettagli di preparazione, conservazione, estrazione e procedure analitiche (e loro precisione) per la sostanza in esame e il contenuto di lipidi.

— I metodi utilizzati di randomizzazione del trattamento e l'assegnazione dei pesci nelle vasche sperimentali.

— Data dell'introduzione degli organismi sperimentali nelle soluzioni di prova e durata della prova.

— Descrizione delle prove eseguite per determinare l'intervallo e i risultati, se disponibili.

Risultati:

— Risultati di eventuali studi preliminari eseguiti.

— Mortalità dei pesci di controllo e dei pesci trattati ed eventuale comportamento anomalo osservato.

— Informazioni su eventuali effetti nocivi osservati.

— Descrizione completa di tutte le procedure di analisi chimiche utilizzate, compresi i limiti di rilevabilità e di quantificazione, la variabilità e il recupero.

— Contenuto di lipidi del pesce, compreso il metodo utilizzato e, se derivato, fattore di normalizzazione dei lipidi (L_n, fattore per esprimere i risultati relativi a un contenuto lipidico del pesce del 5 %).

— Tabella dei dati relativi al peso (e alla lunghezza), riferiti alle concentrazioni chimiche (e al contenuto di grassi, ove necessario) di ciascun pesce dei gruppi di controllo e di trattamento (ad esempio attribuendo un identificatore unico a ciascun pesce campionato) e calcoli per la o le costanti cinetiche di crescita ottenute.

▼M7

— Tabella dei dati relativi alle concentrazioni della sostanza in esame nei pesci (C_f, riferiti a singoli pesci) e nell'acqua (C_w) (con valori medi per gruppo di prova e di controllo, deviazione standard e intervallo, se del caso) per tutti i tempi di campionamento [C_f espresso in mg/kg di peso umido del corpo intero o dei suoi tessuti specificati, per esempio lipidi, e C_w in mg/l). Valori di C_w per la serie di controllo (riportare anche il valore della concentrazione di fondo).

— Curve (con tutti i dati misurati), recanti le seguenti indicazioni (se del caso, le concentrazioni possono essere espresse in relazione al corpo intero e al contenuto di lipidi normalizzato al 5 % dell'animale o di suoi tessuti specificati):

  — la crescita, ossia il peso del pesce in funzione del tempo o logaritmo naturale del peso in funzione del tempo (compresa la costante cinetica di crescita, k_g);

  — l'assorbimento e la depurazione della sostanza in esame nel pesce (su un grafico);

  — tempo di raggiungimento dello stato stazionano (se realizzato);

  — logaritmo naturale della concentrazione in funzione del tempo di assorbimento (compresa la costante cinetica di assorbimento ottenuta k_1);

  — logaritmo naturale della concentrazione in funzione del tempo di depurazione (compresa la costante cinetica di depurazione ottenuta k_2); nonché

  — le curve delle fasi di assorbimento e depurazione, con indicazione dei dati e del modello adattato.

— Se l'esame visivo di un grafico presenta evidenti valori anomali, è possibile applicare un test statisticamente valido ai valori anomali per eliminare i dati corrispondenti e fornire una giustificazione documentata a sostegno di tale scelta.

— Il fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario (BCF_{SS}), se lo stato stazionario è (quasi) raggiunto.

— Il fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_k) e costanti cinetiche di assorbimento e depurazione ottenute k_1 e k_2, assieme alle varianze in k_2 (pendenza e intercetta) se si utilizza un adattamento sequenziale.

— Intervalli di confidenza, deviazione standard (se disponibili) e metodi di calcolo o analisi dei dati per ciascun parametro per ciascuna concentrazione della sostanza in esame usata.

  — Informazioni relative a eventuali metaboliti della sostanza in esame radiomarcata e il loro accumulo.

  — Costante cinetica di crescita (con intervallo di confidenza del 95 %) e costante cinetica di depurazione calcolata corretta per la crescita (k_{2g}), il tempo di dimezzamento e il BCF (BCF_{Kg}).

  — Qualsiasi osservazione insolita registrata durante la prova, eventuali deviazioni dalle procedure e qualsiasi altra informazione pertinente.

  — Una tabella riepilogativa dei pertinenti dati misurati e calcolati, come:

▼M7

Costanti cinetiche di assorbimento e depurazione della sostanza e fattori di bioconcentrazione (BCF)	
kg (costante cinetica di crescita; (giorno^{-1}):	Inserire il valore (95 % CI) ([1])
k_1 *(costante cinetica di assorbimento globale;* kg^{-1} giorno^{-1}):	Inserire il valore (95 % CI) ([1])
k_2 (*costante cinetica di depurazione globale;* giorno^{-1}):	Inserire il valore (95 % CI) ([1])
k_{2g} *(costante cinetica di depurazione corretta per la crescita;* giorno^{-1}):	Inserire il valore (95 % CI) ([1])
C_f *(concentrazione della sostanza nel pesce allo stato stazionario;* mg kg^{-1}):	Inserire il valore ± SD ([2])
C_w *(concentrazione della sostanza in acqua;* mg/l):	Inserire il valore ± SD ([2])
L_n (f*attore di normalizzazione dei lipidi):*	Inserire il valore ([3])
BCF_{SS} (fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario; l kg^{-1})	Inserire il valore ± SD ([2])
BCF_{SSL} (fattore normalizzato di bioconcentrazione dei lipidi allo stato stazionario; l kg^{-1}):	Inserire il valore ([3]) ± SD ([2])
BCF_K (fattore di bioconcentrazione cinetico; l kg^{-1})	Inserire il valore (95 % CI) ([1])
BCF_{Kg} (fattore di bioconcentrazione cinetico corretto per la crescita; l kg^{-1})	Inserire il valore (95 % CI) ([1])
$t_{1/2g}$ *(tempo di dimezzamento corretto per la crescita;* giorno):	Inserire il valore (95 % CI) ([1])
BCF_{KL} (fattore di bioconcentrazione cinetico normalizzato in funzione dei lipidi; l kg^{-1}):	Inserire il valore
BCF_{KLG} (fattore di bioconcentrazione corretto per la crescita normalizzato in funzione dei lipidi; l kg^{-1}):	Inserire il valore

([1]) CI: Intervallo di confidenza (se possibile stimarlo)
([2]) SD: Deviazione standard (se possibile stimarla)

Evitare risultati registrati come «non rilevato/quantificato a questo limite di rilevazione/quantificazione» mediante lo sviluppo di un metodo e di un protocollo sperimentale preliminari, perché tali risultati non possono essere utilizzati per il calcolo delle costanti cinetiche.

C.13 — II **PROVA RIDOTTA DI ESPOSIZIONE DEI PESCI ATTRAVERSO L'AMBIENTE ACQUATICO**

INTRODUZIONE

La crescente esperienza acquisita nella conduzione e nell'interpretazione della prova completa, sia in laboratorio sia da parte degli organismi di regolamentazione, dimostra che, con poche eccezioni, è applicabile la cinetica di primo ordine per calcolare le costanti cinetiche di assorbimento e depurazione. Pertanto, è possibile stimare le costanti cinetiche di assorbimento e depurazione con un minimo di punti di campionamento e ottenere il BCF cinetico.

Lo scopo iniziale di esaminare disegni sperimentali alternativi per lo studio del BCF consisteva nello sviluppare una prova ridotta da applicare in una fase di

▼M7

prova intermedia al fine di confutare o confermare le stime del BCF basate su valori K_{ow} e QSAR, ed eliminare in tal modo la necessità di eseguire uno studio completo per molte sostanze, e anche per minimizzare i costi e il numero di animali utilizzati, riducendo i campionamenti e le sequenze analitiche effettuate. Pur seguendo il principale disegno del precedente metodo di prova per consentire l'integrazione dei risultati della sperimentazione con i dati esistenti relativi al BCF e per facilitare l'esecuzione di prove e interpretazione dei dati, l'obiettivo consisteva nel fornire stime del BCF sufficientemente accurate e precise per valutare i rischi e adottare le decisioni pertinenti. Valgono molte delle considerazioni fatte per la prova completa, ad esempio i criteri di validità (cfr. paragrafo 24) e quelli per porre fine ad una prova se l'assorbimento riscontrato è trascurabile al termine della fase di assorbimento (cfr. paragrafi 16 e 38).

Le sostanze che si prestano a questo disegno sperimentale ridotto devono essere pertinenti per il settore generale per il quale il presente metodo di prova è stato elaborato, vale a dire le sostanze organiche non polari (cfr. paragrafo 49). Qualora risulti che la sostanza in esame si comporta diversamente (se ad esempio presenta una chiara deviazione dalla cinetica di primo ordine), è opportuno effettuare, a fini regolamentari, una prova completa.

In genere, la prova ridotta non si esegue su un periodo sperimentale più breve rispetto alla prova standard del BCF, ma richiede un ridotto campionamento dei pesci (cfr. l'appendice 6 per una spiegazione). Tuttavia, il periodo di depurazione può essere ridotto per le sostanze a depurazione rapida in modo da evitare che le concentrazioni nel pesce scendano al di sotto del limite di rilevazione/quantificazione prima della fine della prova. Una prova ridotta di esposizione attraverso l'ambiente acquatico con un'unica concentrazione può servire a determinare se è necessario condurre una verifica completa, e se i dati utilizzati per calcolare le costanti cinetiche e il BCF sono affidabili (cfr. paragrafo 93), la prova completa può essere omessa a condizione che il BCF ottenuto sia lontano dai valori regolamentari che destano preoccupazione.

In alcuni casi può essere utile eseguire la prova con più di una concentrazione di prova, come prova preliminare per determinare se le stime del fattore di bioconcentrazione (BCF) per una sostanza chimica sono dipendenti dalla concentrazione. Se sulla base della prova ridotta le stime del BCF risultano dipendenti dalla concentrazione, è necessario eseguire una prova completa. Se, invece, sulla base di una prova ridotta, le stime del BCF risultano indipendenti dalla concentrazione, ma i risultati non sono considerati definitivi, qualsiasi ulteriore prova completa può essere effettuata con un'unica concentrazione, riducendo in tal modo il numero degli animali utilizzati rispetto a una prova completa con due (o più) concentrazioni.

Le sostanze potenzialmente ammissibili alla prova ridotta devono:

— poter presentare cinetiche approssimative di assorbimento e di eliminazione di primo ordine, ottenute per esempio mediante riferimenti incrociati con sostanze simili;

— presentare un log $K_{ow} < 6$, a meno che non sia previsto un rapido metabolismo; ([1])

— essere sufficientemente solubili in acqua per la tecnica analitica utilizzata (cfr. paragrafo 24);

— essere chiaramente quantificabili (ad esempio le concentrazioni dovrebbero essere almeno di un ordine di grandezza superiori al limite di quantificazione), sia nei pesci che nell'acqua; è raccomandata una radiomarcatura (cfr. paragrafo 23); e

— avere un periodo di depurazione superiore al tempo di dimezzamento previsto (per i calcoli cfr. appendice 5) oppure la durata di depurazione va adeguata di conseguenza (cfr. paragrafo 91). Un'eccezione a questa regola è ammessa qualora sia previsto un metabolismo rapido della sostanza.

([1]) La prova ridotta può infatti essere utilizzata per dimostrare un metabolismo rapido, quando è noto che un metabolismo rapido è probabile.

▼M7

PROGRAMMA DI CAMPIONAMENTO PER GLI STUDI ESEGUITI IN BASE AL DISEGNO SPERIMENTALE RIDOTTO

Campionamento del pesce

Il campionamento dei pesci è ridotto a quattro tempi di campionamento:

— A metà e alla fine della fase di assorbimento (l'ultimo prelievo segna l'inizio della fase di depurazione) ad es. dopo 14 e 28 giorni (33).

— A metà della fase di depurazione e a conclusione dello studio (se la concentrazione della sostanza è < 10 % della concentrazione massima, o quando sia chiaramente superato un tempo di dimezzamento della sostanza), ad esempio dopo 7 e 14 giorni di depurazione (33). Se è prevista o riscontrata una depurazione rapida, può essere necessario abbreviare il periodo di depurazione per evitare che le concentrazioni nel pesce scendano al di sotto del limite di quantificazione.

— Misurazione del contenuto di grassi come nella prova completa.

— Correzione della crescita come nella prova completa.

— Il BCF è calcolato come fattore di bioconcentrazione cinetico.

Campionamento dell'acqua

Nella prova ridotta, l'acqua viene prelevata come nella prova completa (cfr. paragrafo 54) o almeno cinque volte ad intervalli regolari durante la fase di assorbimento e una volta alla settimana durante la fase di depurazione.

Modifiche del disegno sperimentale

In funzione delle proprietà della sostanza in esame, della validità delle previsioni QSAR e delle specifiche finalità dello studio, possono essere prese in considerazione alcune modifiche nel disegno sperimentale.

— Se è necessaria una maggior precisione, è possibile utilizzare più pesci (6 o 8 invece di 4) al momento del campionamento al termine della fase di assorbimento.

— Si includerà un altro gruppo di pesci se dopo 14 giorni (o al termine della durata prevista della fase di depurazione) la depurazione non è sufficiente (> 50 %). Se la durata prevista della fase di depurazione è inferiore o superiore a 14 giorni, è opportuno adeguare il programma di campionamento (un gruppo di pesci al termine della fase di depurazione, e un gruppo alla metà di tale fase).

— Si devono usare due concentrazioni di prova per esaminare la possibile dipendenza dalla concentrazione. Se i risultati della prova ridotta, con due concentrazioni di esposizione, dimostrano che il BCF è indipendente dalla concentrazione (differenza inferiore al 20 %), si potrà ritenere che una concentrazione di esposizione sia sufficiente in caso di eventuale prova completa.

— È probabile che i modelli di processi di bioaccumulo come quelli proposti da *Arnot et al.* (35) possano contribuire a prevedere la durata delle fasi di assorbimento e di depurazione (cfr. anche appendice 5).

Calcoli

Il motivo di questa impostazione è che il fattore di bioconcentrazione in una prova completa può essere determinato come fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario (BCF_{SS}) calcolando il rapporto tra la concentrazione della sostanza in esame nei tessuti del pesce e la concentrazione della sostanza in esame nell'acqua, o calcolando il fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_K), vale a dire il rapporto tra la costante cinetica di assorbimento k_1 e la costante cinetica di depurazione k_2. Il BCF_K sarebbe valido anche se una concentrazione di una

▼M7

sostanza allo stato stazionario non è raggiunta durante l'assorbimento, a condizione che l'assorbimento e la depurazione seguano essenzialmente processi cinetici di primo ordine. Almeno due punti sono necessari per stimare le costanti cinetiche di assorbimento e di depurazione, alla fine della fase di assorbimento (ossia all'inizio della fase di depurazione) e l'altro alla fine della fase di depurazione (o in uno stadio avanzato della fase di depurazione). Il punto di campionamento intermedio è raccomandato per controllare le cinetiche di assorbimento e di depurazione ([1]). Per i calcoli, cfr. le appendici 5 e 6.

Interpretazione dei risultati

Per valutare la validità e il valore informativo della prova, occorre verificare che il periodo di depurazione sia superiore a un tempo di dimezzamento. Analogamente, si confronta il BCF_{Km} (BCF cinetico ottenuto da una prova ridotta) con il valore del BCF_{SS} ridotto (che corrisponde al BCF_{SS} calcolato alla fine della fase di assorbimento, supponendo che sia stato raggiunto lo stato stazionario. Ciò può essere solo presunto, in quanto il numero di punti di campionamento non è sufficiente a dimostrarlo). Se il $BCF_{Km} < BCF_{SS}$ ridotto, quest'ultimo sarà il valore da privilegiare. Se BCF_{Km} è inferiore al 70 % del BCF_{SS} ridotto, i risultati non sono validi, e occorre eseguire una prova completa.

Se la prova ridotta dà un BCF_{Km} che si colloca nell'intervallo di qualsiasi valore che desta preoccupazione in base alla regolamentazione, dovrà essere eseguita una prova completa. Se il risultato è lontano da qualunque valore regolamentare preoccupante (nettamente superiore o inferiore), una prova completa può non essere necessaria, o si potrà effettuare uno studio completo con un'unica concentrazione se richiesto dal pertinente quadro normativo.

Se al termine di una prova ridotta con un'unica concentrazione risulta necessario eseguire una prova completa, questa potrà essere eseguita con una seconda concentrazione. Se i risultati corrispondono, si potrà fare a meno di una prova completa con una concentrazione diversa, poiché la bioconcentrazione della sostanza non dovrebbe dipendere dalla concentrazione. Se la prova ridotta è stata eseguita con due concentrazioni e i risultati non mostrano una dipendenza dalla concentrazione, si può eseguire la prova completa con un'unica concentrazione (cfr. paragrafo 87)

Relazione sulla prova

La relazione della prova ridotta comprende tutte le informazioni richieste per la prova completa (cfr. paragrafo 81), a eccezione di quelle che non è possibile ottenere (vale a dire la curva indicante il rapporto tempo/stato stazionario e tempo/fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario; per quest'ultimo dovrà essere indicato, invece, il BCFss ridotto). Occorrerà altresì precisare le ragioni per le quali è stato deciso di condurre una sperimentazione ridotta, e indicare il BCF_{Km} risultante.

C.13 — III **PROVA DI BIOACCUMULO NEI PESCI CON ESPOSIZIONE PER VIA ALIMENTARE**

INTRODUZIONE

Il metodo descritto nella presente sezione si applica alle sostanze che non si prestano a una prova mediante l'esposizione in ambiente acquatico (ad esempio perché non è possibile mantenere concentrazioni stabili e misurabili in acqua o il carico corporeo non può essere raggiunto in 60 giorni di esposizione; cfr. le sezioni precedenti per il metodo di esposizione in ambiente acquatico). Va rilevato tuttavia che il risultato da questa prova sarà un fattore di biomagnificazione per via alimentare (BMF) e non un fattore di bioconcentrazione (BCF) ([2]).

Nel maggio 2001 un nuovo metodo per le prove di bioaccumulo di sostanze organiche scarsamente solubili in acqua è stato presentato alla conferenza SETAC Europe tenutasi a Madrid (36). Questo lavoro si basa su una serie di studi di bioaccumulo riportati nella letteratura che utilizzano un metodo di misurazione con una dieta addizionata [cfr. ad esempio (37)]. Nei primi mesi del 2004 un progetto di protocollo (38) volto a misurare il potenziale di bioaccumulo delle

([1]) Se sono misurati solo due dati, è possibile ottenere stime degli intervalli di confidenza per il BCF_{Km} mediante una tecnica di bootstrap. Quando sono disponibili anche valori intermedi è possibile calcolare anche gli intervalli di confidenza per il BCF_{Km} come nella prova completa.

([2]) Cfr. appendice 1, Definizioni e unità di misura.

▼M7

sostanze organiche scarsamente solubili in acqua alle quali non era applicabile il metodo di bioconcentrazione mediante l'esposizione attraverso l'ambiente acquatico, insieme a un documento di riferimento (39), è stato sottoposto al gruppo di lavoro PBT dell'UE. Tra le ragioni addotte per applicare tale metodo, è stato indicato che l'esposizione potenziale nell'ambiente a tali sostanze scarsamente solubili (log K_{ow} > 5) avviene probabilmente in larga misura per via alimentare [cfr. (40) (41) (42) (43) (44)]. Per questa ragione, le prove con esposizione per via alimentare sono indicate in taluni regolamenti relativi alle sostanze chimiche ([1]). Va rilevato, tuttavia, che il metodo qui descritto evita accuratamente l'esposizione attraverso l'ambiente acquatico e, di conseguenza, un BMF ottenuto da tale metodo di prova non è direttamente comparabile con un BMF ottenuto con uno studio sul campo (che consente una combinazione di esposizione in ambiente acquatico e per via alimentare).

Questa sezione si basa sul presente protocollo (38) e presenta una nuova metodologia che non figurava nella versione precedente del metodo C.13. Questa prova alternativa consente di esaminare direttamente l'esposizione per via alimentare, in condizioni controllate di laboratorio.

Prima di procedere a tale esame, occorre fare riferimento ai paragrafi da 1 a 14 del presente metodo di prova per comprendere le circostanze nelle quali l'esperimento con esposizione per via alimentare è preferibile all'esame con esposizione in ambiente acquatico. Tali paragrafi contengono anche informazioni sulle sostanze, e occorre prenderne conoscenza prima di eseguire la prova.

L'utilizzo di sostanze radiomarcate può essere considerato per gli stessi motivi addotti per il metodo di esposizione in ambiente acquatico (cfr. paragrafi 6 e 65).

Il metodo di esposizione per via alimentare può servire ad analizzare più sostanze in un'unica prova, se sono soddisfatti determinati criteri, esaminati in dettaglio nel paragrafo 112. Per maggiore semplicità, il metodo qui presentato descrive la prova eseguita con una sola sostanza in esame.

La prova con esposizione per via alimentare è simile alla prova con esposizione attraverso l'ambiente acquatico sotto molto aspetti ad eccezione, ovviamente, della modalità di esposizione. Pertanto il metodo qui proposto si sovrappone in molti punti al metodo di esposizione in ambiente acquatico di cui alla sezione precedente. Per quanto possibile sono stati introdotti rinvii ai paragrafi pertinenti della sezione precedente, ma per motivi di leggibilità e di comprensione alcune ripetizioni risultano inevitabili.

PRINCIPIO DELLA PROVA

Si possono utilizzare condizioni a flusso continuo o semistatiche (cfr. paragrafo 4). Le prove a flusso continuo sono preferibili per limitare l'esposizione potenziale della sostanza in esame attraverso l'ambiente acquatico a seguito di desorbimento degli alimenti addizionati o feci. La prova consta di due fasi: assorbimento (sostanza in esame-mangimi addizionati) e depurazione (mangimi «puliti», non trattati) (cfr. paragrafo 16). Durante la fase di assorbimento, un gruppo di pesci soggetto a esposizione è alimentato quotidianamente con mangimi commerciali specifici per specie ittiche di composizione nota, addizionati con la sostanza in esame. Idealmente, i pesci dovrebbero consumare tutti i prodotti alimentari offerti (cfr. paragrafo 141). Durante la fase di depurazione, i pesci sono quindi alimentati con il medesimo mangime commerciale «puro» (non trattato). Con il metodo di esposizione attraverso l'ambiente acquatico, è possibile, se necessario, utilizzare più di un gruppo variando la concentrazione della sostanza in esame, ma per la maggior parte delle sostanze organiche fortemente idrofobe è sufficiente un solo gruppo di trattamento (cfr. paragrafi 49 e 107). In condizioni semistatiche il pesce è trasferito in un nuovo ambiente e/o una nuova vasca di trattamento alla fine della fase di assorbimento (nel caso in cui il terreno

([1]) Ai fini dell'applicazione del regolamento (CE) n. 1907/2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) (GU L 396 del 30.12.2006, pag. 1), la questione è affrontata nella «Guida alle prescrizioni in materia di informazione e alla valutazione della sicurezza chimica», capitolo R.7c, R.7.10.3.1, pp 13; R.7.10.4.1, pp 31-32; e figura R7.10-2, pp 50.

▼M7

o l'apparecchiatura utilizzata durante la fase di assorbimento siano stati contaminati dalla sostanza in esame mediante lisciviazione). Le concentrazioni della sostanza in esame nel pesce sono misurate in entrambe le fasi della prova. Oltre al gruppo di pesci alimentati con una dieta addizionata (il gruppo di trattamento), un gruppo di pesci di controllo viene mantenuto in condizioni identiche e con il medesimo regime alimentare, tranne il fatto che il mangime non è addizionato della sostanza in esame. Il gruppo di controllo permette di quantificare la concentrazione della sostanza in esame nei pesci non esposti e serve da termine di riferimento qualora si osservassero effetti nocivi imputabili al trattamento nel gruppo o gruppi di trattamento ([1]). Ciò consente inoltre il confronto dei tassi di crescita costanti tra i gruppi per accertare che siano state consumate medesime quantità di alimentazione (occorre anche tenere conto delle qualità organolettiche potenzialmente diverse dei mangimi per spiegare la differenza tra le costanti cinetiche di crescita; *Cfr. paragrafo 138).* È importante che durante le fasi di assorbimento e di depurazione, i regimi alimentari dei gruppi di trattamento e di controllo siano equivalenti sotto il profilo nutrizionale.

Una fase di assorbimento che dura tra 7 e 14 giorni è generalmente sufficiente, sulla base dell'esperienza maturata dagli sperimentatori che hanno messo a punto tali metodi di prova (38) (39). Tale durata dovrebbe consentire di minimizzare i costi dell'esperimento, garantendo un'esposizione sufficiente per la maggior parte delle sostanze. Tuttavia, in alcuni casi può essere più opportuno prolungare la fase di assorbimento (cfr. paragrafo 127). Durante la fase di assorbimento, la concentrazione della sostanza nei pesci può non raggiungere lo stato stazionario, pertanto il trattamento dei dati e i risultati ottenuti con tale metodo si basano in generale su una analisi cinetica dei residui tessutali. (Nota: si possono applicare anche in questo caso le equazioni per calcolare il tempo di raggiungimento dello stato stazionano utilizzate nella prova con esposizione in ambiente acquatico (cfr. appendice 5). La fase di depurazione inizia dal momento in cui si somministrano ai pesci mangimi non addizionati; essa dura solitamente fino a 28 giorni, o qualora ciò richieda tempi più brevi, fino a quando la sostanza in esame non sia più quantificabile nel pesce intero. La fase di depurazione può essere abbreviata o prolungata oltre i 28 giorni, secondo le variazioni nel tempo delle concentrazioni chimiche misurate e delle dimensioni dei pesci.

Questo metodo consente di determinare il tempo di dimezzamento specifico della sostanza ($t_{1/2}$, in base alla costante cinetica di depurazione, k_2), l'efficienza di assimilazione (assorbimento intestinale; *a*), il fattore di biomagnificazione alimentare cinetico (BMF_K), il fattore di biomagnificazione cinetico per via alimentare corretto per la crescita (BMF_{Kg}) e il fattore di biomagnificazione cinetico per via alimentare corretto per il tenore lipidico (BMF_{KL}) (e/o il fattore di biomagnificazione cinetico per via alimentare corretto per la crescita e per i grassi, BMF_{KgL}) per la sostanza in esame nel pesce ([2]). Per quanto riguarda il metodo di esposizione in ambiente acquatico, l'aumento di peso del pesce durante l'esperimento provocherà la diluizione della sostanza in esame. Conseguentemente, il BMF (cinetico) risulterà sottostimato se non corretto per la crescita (cfr. paragrafi 162 e 163). Inoltre, se si ritiene che lo stato stazionario sia stato raggiunto nella fase di assorbimento, si può calcolare il BMF indicativo allo stato stazionario. Diversi metodi consentono di calcolare un fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_K) a partire dai dati ottenuti nello studio per via alimentare [ad esempio (44) (45) (46) (47) (48)]. I pro e i contro di questi approcci sono analizzati nell'appendice 8.

([1]) Per la maggior parte delle sostanze in esame idealmente non si dovrebbe individuare alcunché nell'acqua di controllo. Le concentrazioni naturali sono pertinenti solo per i materiali presenti in natura (alcuni metalli) e per le sostanze presenti ovunque nell'ambiente.

([2]) Il BMF è definito come il rapporto tra la concentrazione di una sostanza in un organismo e la concentrazione della sostanza nell'alimentazione di tale organismo allo stato stazionario, i grassi sono presi in considerazione correggendo i valori ottenuti in funzione dei lipidi presenti nell'organismo e nei mangimi, da cui il termine più preciso di «correzione». Tale approccio differisce dalla «normalizzazione» rispetto a un determinato tenore in lipidi dell'organismo, come avviene nella prova di bioconcentrazione mediante l'esposizione in ambiente acquatico.

▼M7

La prova è stata concepita in primo luogo per le sostanze organiche non polari scarsamente solubili in acqua che seguono essenzialmente cinetiche di assorbimento e di depurazione di primo ordine nei pesci. Quando la sostanza in esame non segue cinetiche di assorbimento e di depurazione di primo ordine, occorre impiegare modelli più complessi (cfr. bibliografia dell'appendice 5) con l'assistenza di un esperto in biostatistica e/o farmacocinetica.

Di norma, si determina il BMF utilizzando l'analisi della sostanza in esame per il pesce intero (peso umido). Se pertinenti in relazione agli obiettivi dello studio, è possibile prelevare determinati tessuti (ad esempio muscolo, fegato) se il pesce è diviso in parti commestibili e non commestibili (cfr. paragrafo 21). Inoltre, la rimozione e l'analisi separata del tubo gastroenterico possono servire a determinare il contributo alle concentrazioni in pesci interi a diversi tempi di campionamento, alla fine della fase di assorbimento e all'inizio della fase di depurazione, o nel quadro di un approccio basato sul bilancio di massa.

Il tenore lipidico dei pesci (interi) campionati è misurato per garantire che le concentrazioni siano corrette per i grassi, tenendo conto del tenore lipidico sia contenuto nei mangimi sia presente nei pesci (cfr. paragrafi 56 e 57 e appendice 7).

Ogni pesce campionato viene pesato e il peso viene registrato e collegato alla concentrazione chimica analizzata per tale esemplare (ad esempio attribuendo un identificatore unico a ciascun pesce campionato), per calcolare la crescita del pesce in fase di prova. Nella misura del possibile, occorre misurare la lunghezza totale del pesce ([1]). I dati relativi al peso sono necessari anche per stimare il fattore di bioconcentrazione (BCF) utilizzando i dati della fase di depurazione dalla prova con esposizione per via alimentare.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

Occorre disporre delle informazioni sulla sostanza in esame descritte ai paragrafi 3 e 22. Un metodo per analizzare le concentrazioni della sostanza in esame nell'acqua non è in genere necessario; i metodi da applicare devono presentare una sensibilità appropriata per misurare le concentrazioni nei mangimi per pesce e nei tessuti del pesce.

Il metodo può essere impiegato per valutare più di una sostanza durante un'unica prova. Tuttavia, le sostanze in esame dovranno essere compatibili tra loro, di modo che non interagiscano o cambino la loro identità chimica dopo l'addizione in un mangime per pesci. L'obiettivo è che i risultati misurati per ogni sostanza testata congiuntamente non differiscano notevolmente dai risultati che sarebbero stati ottenuti con prove individuali per ciascuna sostanza in esame. Una valutazione analitica preliminare dovrebbe stabilire che ciascuna sostanza può essere isolata da un campione di pesce o di mangime addizionato di diverse sostanze, con i) livelli elevati di recupero (> 85 % del valore nominale) e ii) la sensibilità necessaria al corretto svolgimento della prova. La quantità totale delle sostanze testate congiuntamente dovrebbe essere inferiore alla concentrazione combinata che potrebbe causare effetti tossici (cfr. paragrafo 51). Il disegno sperimentale dovrebbe inoltre tener conto dei potenziali effetti nocivi nei pesci e delle possibili interazioni (effetti metabolici) associati all'esame congiunto di più sostanze. Occorre evitare di esaminare contemporaneamente le sostanze ionizzabili. In termini di esposizione, il metodo si presta anche a miscele complesse (cfr. paragrafo 13, anche se i limiti dell'analisi saranno gli stessi con qualsiasi metodo).

VALIDITÀ DELLA PROVA

La validità della prova è subordinata all'osservanza delle seguenti condizioni (cfr. paragrafo 24):

— la variazione della temperatura dell'acqua è inferiore a ± 2 °C nei gruppi di controllo e nei gruppi trattati;

([1]) La lunghezza totale deve essere registrata durante la prova, poiché costituisce un buon indicatore degli eventuali effetti nocivi osservati.

▼M7

— la concentrazione dell'ossigeno disciolto è superiore o uguale al 60 % del valore di saturazione dell'aria;

— la concentrazione della sostanza in esame nel mangime per pesci prima e alla fine della fase di assorbimento è compresa in un intervallo di ± 20 % (sulla base di almeno tre prelievi effettuati in questi due momenti);

— un elevato grado di omogeneità della sostanza nei mangimi è dimostrato mediante analisi preliminare sui mangimi addizionati; almeno tre concentrazioni della sostanza misurata su campioni prelevati all'inizio della prova non devono variare di oltre ± 15 % dalla media;

— la concentrazione della sostanza in esame non è individuata, o solo sotto forma di tracce abituali, nell'alimentazione non addizionata o nei tessuti del pesce di controllo rispetto ai campioni trattati;

— la mortalità, le malattie o altri effetti nocivi sia nei gruppi di pesci di controllo sia in quelli trattati è inferiore o uguale al 10 % al termine della prova. Se la prova viene prolungata per qualsiasi motivo, gli effetti nocivi in entrambi i gruppi sono inferiori o pari al 5 % al mese, e al 30 % cumulativamente. Differenze significative di crescita media tra i campioni del gruppo di prova e del gruppo di controllo potrebbero indicare un effetto tossico della sostanza in esame.

SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Se un laboratorio non ha effettuato la prova in precedenza o se ha apportato modifiche significative (cambio di ceppo o di fornitore di pesci, specie ittica diversa, cambiamento significativo delle dimensioni o dell'alimentazione dei pesci, o del metodo di arricchimento, ecc.), si consiglia di verificare le competenze tecniche disponibili, utilizzando una sostanza di riferimento. La sostanza di riferimento viene usata principalmente per stabilire se la tecnica di arricchimento dell'alimentazione consente di garantire l'omogeneità e la biodisponibilità massime delle sostanze di prova. Ad esempio, la sostanza di riferimento per le sostanze idrofobe non polari è l'esaclorobenzene (HCB), ma a causa delle proprietà pericolose dell'HCB dovrebbero essere considerate altre sostanze per le quali sono disponibili dati affidabili sull'assorbimento e sulla biomagnificazione ([1]). Se utilizzata, informazioni generali sulla sostanza di riferimento devono figurare nella relazione sulla prova, in particolare il nome, la purezza, il numero CAS, la struttura, la tossicità (se disponibile), come per le sostanze in esame (cfr. paragrafi 3 e 22).

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiatura

Il materiale e le apparecchiature vanno utilizzati come descritto per la prova di esposizione in ambiente acquatico (cfr. paragrafo 26). Occorre utilizzare un sistema di rinnovo a flusso continuo o statico che fornisca un volume di acqua di diluizione sufficiente alle vasche sperimentali. Le portate devono essere registrate.

Acqua

L'acqua di prova è utilizzata come descritto per la prova di esposizione in ambiente acquatico (cfr. paragrafi da 27 a 29). Il mezzo di prova deve presentare le caratteristiche richieste e la sua qualità va mantenuta costante per tutta la durata della prova. Il contenuto naturale di particolato e il carbonio organico totale deve essere il più basso possibile (≤ 5 mg/l di particolato; ≤ 2 mg/l di carbonio organico totale) prima dell'inizio della prova. Il carbonio organico totale è misurato solo prima della prova al momento della caratterizzazione dell'acqua utilizzata per la prova (cfr. paragrafo 53).

([1]) L'HCB figura negli elenchi degli allegati A e C della convenzione di Stoccolma, nonché negli allegati I e III del regolamento (CE) n. 850/2004 relativo agli inquinanti organici persistenti (GU L 158 del 30.4.2004, pag. 7).

▼M7

Regime alimentare

Si raccomanda l'uso di mangime per pesci disponibile in commercio (con granuli galleggianti e/o a discesa lenta), caratterizzato almeno in termini di proteine e di materie grasse. I granuli presentano una dimensione uniforme per accrescere l'efficienza dell'esposizione per via alimentare; in questo modo, i pesci mangeranno di più, poiché non si limiteranno a mangiare solo i pezzi più grossi, tralasciando quelli piccoli. È inoltre necessario che la dimensione dei granuli sia adeguata alla dimensione dei pesci all'inizio della prova (diametro di circa 0,6-0,85 mm per i pesci di lunghezza compresa tra 3 e 7 cm, e di 0,85-1,2 mm per i pesci di lunghezza compresa tra 6 e 12 cm). È possibile uniformare la dimensione dei granuli in funzione dello sviluppo dei pesci all'inizio della fase di depurazione. L'appendice 7 contiene un esempio di un'adeguata composizione degli alimenti per uso commerciale. Nello sviluppo del presente metodo sono stati utilizzati in genere regimi alimentari con un tenore lipidico compreso fra 15 e 20 % (peso umido). È possibile che mangimi per pesci con un tenore di grassi così elevato non siano disponibili in determinate regioni. In tal caso, la prova può essere effettuata con un tenore di grassi inferiore e, se necessario, il tasso di somministrazione va adeguato in modo da mantenere lo stato di salute dei pesci (sulla base di una prova preliminare). Il tenore totale di lipidi dell'alimentazione del gruppo trattato e del gruppo di controllo è misurato e registrato prima dell'inizio della prova e al termine della fase di assorbimento. La relazione sulla prova deve presentare le informazioni dettagliate indicate dal fornitore di mangimi commerciali relativamente all'analisi dei nutrienti, del tenore di umidità, fibre e ceneri e, se possibile, dei minerali e dei residui di pesticidi (ad es. inquinanti prioritari «standard»).

Al momento di addizionare il mangime con la sostanza in esame, occorre garantire, per quanto possibile, l'omogeneità dei mangimi utilizzati durante la prova. La concentrazione della sostanza in esame nella dieta del gruppo trattato è selezionata in funzione della sensibilità della tecnica di analisi, della tossicità della sostanza in esame (NOEC se nota) e dei dati fisico-chimici pertinenti. Se utilizzata, è opportuno incorporare la sostanza di riferimento ad una concentrazione di circa il 10 % di quella della sostanza in esame (o comunque quanto più bassa possibile), in funzione della sensibilità dell'analisi (ad esempio per l'esaclorobenzene, una concentrazione nei mangimi di 1-100 μg/g è stata giudicata accettabile; cfr. (47) per maggiori informazioni sull'efficienza di assimilazione dell'HCB).

La sostanza in esame può essere aggiunta ai mangimi per pesci in modi diversi, secondo le caratteristiche fisiche e la solubilità (cfr. appendice 7 per maggiori informazioni sui metodi di arricchimento):

— se la sostanza è solubile e stabile in trigliceridi, scioglierla in una piccola quantità di olio di pesce o di olio vegetale commestibile prima di mescolarla al mangime per pesci. In tal caso, occorre evitare accuratamente di produrre una razione troppo ricca di lipidi, tenendo conto del tenore naturale di lipidi degli alimenti arricchiti e quindi aumentando la quantità minima nota di olio necessaria per una distribuzione omogenea della sostanza in esame nei mangimi, oppure;

— addizionare i mangimi utilizzando un solvente organico adatto, fintantoché l'omogeneità e la biodisponibilità non siano compromesse [(micro) cristalli della sostanza in esame potrebbero formarsi negli alimenti in seguito all'evaporazione del solvente, e non esistono metodi facili per dimostrare che tale evaporazione non è avvenuta; cfr. (49)]; oppure

— aggiungere liquidi non viscosi direttamente al mangime per pesci, ma occorre mescolare bene per garantire una ripartizione omogenea e facilitarne l'assimilazione. È opportuno che la tecnologia di miscelazione garantisca l'omogeneità del mangime addizionato.

▼M7

In alcuni casi, ad esempio nelle prove con sostanze meno idrofobe con maggiore probabilità di deassorbimento dagli alimenti, potrebbe essere necessario rivestire i granuli con una piccola quantità di olio di pesce/mais (cfr. paragrafo 142). In tal caso, anche il mangime di controllo va trattato in modo analogo e il mangime così preparato va utilizzato ai fini della misurazione del tenore di grassi.

Se del caso, i risultati sulla sostanza di riferimento devono essere comparabili con i dati delle prove descritte in letteratura e condotte in condizioni analoghe con una razione alimentare comparabile (cfr. paragrafo 45), e parametri specifici alla sostanza di riferimento devono corrispondere ai pertinenti criteri di cui al paragrafo 113 (3°, 4° e 5° punto).

Se un olio o un solvente è utilizzato come disperdente per la sostanza in esame, si mescoli un quantitativo equivalente di tale disperdente (escludendo la sostanza in esame) al mangime di controllo al fine di mantenere l'equivalenza con il mangime addizionato. È importante che durante le fasi di assorbimento e di depurazione i gruppi trattati e di controllo ricevano un'alimentazione equivalente.

La dieta arricchita è conservata in condizioni che mantengono la stabilità della sostanza in esame nel mix di mangimi (ad es. mediante refrigerazione) e tali condizioni vanno registrate.

Selezione della specie ittica

Tale prova può essere effettuata con le specie ittiche indicate per l'esposizione in ambiente acquatico (cfr. paragrafo 32 e appendice 3). Prima della pubblicazione del presente metodo di prova, gli studi sul bioaccumulo mediante regime alimentare con sostanze organiche utilizzavano sistematicamente la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), la carpa (*Cyprinus carpio*) e il ciprinide *Fathead minnow* (*Pimephales promelas)*. È opportuno che le specie esaminate abbiano un comportamento alimentare consistente in un rapido consumo della razione somministrata in modo da ridurre al minimo l'influenza potenziale di qualsiasi fattore che incide sulla concentrazione della sostanza in esame nell'alimento (ad esempio, lisciviazione in acqua e possibile esposizione all'ambiente acquatico). La lunghezza e il peso dei pesci utilizzati sono compresi nei limiti raccomandati (cfr. appendice 3). I pesci non devono essere troppo piccoli da ostacolare le analisi sui singoli esemplari. L'esame delle specie in un periodo di rapido accrescimento può rendere difficile l'interpretazione dei dati, e gli elevati tassi di crescita possono influenzare il calcolo dell'efficienza di assimilazione ([1]).

Mantenimento dei pesci

I criteri relativi all'acclimatazione, alla mortalità e ad eventuali malattie sono gli stessi del metodo di esposizione in ambiente acquatico (cfr. paragrafi da 33 a 35).

ESECUZIONE DELLA PROVA

Documento di lavoro e test di definizione dell'intervallo di concentrazioni

Un'analisi preliminare è necessaria per dimostrare la possibilità di isolare la sostanza nei mangimi addizionati o nei tessuti dei pesci. Non è sempre necessario eseguire una prova di determinazione dell'intervallo di concentrazione (*range-finding test*) per decidere la concentrazione adeguata della sostanza chimica nel mangime. Al fine di dimostrare che non si osserva alcun effetto nocivo, di valutare le qualità organolettiche dei mangimi addizionati, di determinare la

([1]) In caso di rapida crescita durante la fase di assorbimento, la razione alimentare reale scenderà al di sotto di quella definita all'inizio dell'esposizione.

▼M7

sensibilità del metodo di analisi nei tessuti dei pesci e dei mangimi e di definire la razione alimentare e i tempi di campionamento adeguati durante la fase di depurazione, ecc., è possibile — ma non obbligatorio — procedere a prove di alimentazione preliminari. Uno studio di osservazione preliminare può essere utile per stimare il numero di pesci necessari per il campionamento durante la fase di depurazione. Ciò può ridurre notevolmente il numero di pesci utilizzati, soprattutto per le sostanze in esame che sono particolarmente sensibili al metabolismo.

Condizioni di esposizione

Durata della fase di assorbimento

Una fase di assorbimento di 7-14 giorni è normalmente sufficiente. In questa fase a un gruppo di pesci viene somministrato il mangime di controllo e a un altro gruppo il mangime trattato. La razione alimentare che viene loro somministrata ogni giorno dipende dalla specie utilizzata e dalle condizioni sperimentali; sarà, ad esempio, tra l'1 e il 2 % del peso del pesce (peso umido) nel caso della trota iridea. La frequenza di alimentazione va definita in modo da evitare una rapida crescita e un aumento significativo del tenore di grassi. Se necessario, è possibile prolungare la fase di assorbimento in funzione degli insegnamenti tratti da studi precedenti o di informazioni note sull'assorbimento o sulla depurazione della sostanza in esame (o analoga) nei pesci. L'inizio della prova è stabilito al momento della prima somministrazione della dieta addizionata. Un giorno di prova è calcolato dal momento della somministrazione di una razione alimentare fino a poco prima della razione successiva (ad esempio, un'ora prima). Pertanto, nella fase di assorbimento, il primo giorno di prova inizia con la prima somministrazione della dieta addizionata e termina subito prima della seconda razione addizionata. In pratica, la fase di assorbimento termina subito prima (ad esempio un'ora prima) della prima somministrazione di cibo non addizionato della sostanza in esame, dato che il pesce continua a digerire gli alimenti addizionati e ad assorbire la sostanza in esame nel corso delle successive 24 ore. È importante assicurare che il carico corporeo della sostanza in esame sia sufficientemente elevato (non tossico) per quanto riguarda il metodo di analisi, affinché si possa misurare un calo di almeno un ordine di grandezza durante la fase di depurazione. In taluni casi si può prolungare la fase di assorbimento (fino a 28 giorni) effettuando campionamenti supplementari per approfondire le conoscenze sulla cinetica di assorbimento. Durante l'assorbimento, la concentrazione nel pesce può non raggiungere lo stato stazionario. Per stimare il tempo occorrente per raggiungere lo stato stazionario, e avere così un'indicazione della probabile durata necessaria per ottenere concentrazioni significative nel pesce, è possibile applicare le equazioni indicate per la prova di esposizione in ambiente acquatico (cfr. appendice 5).

In alcuni casi potrebbe essere noto in anticipo che una durata di assorbimento di 7-14 giorni della sostanza chimica nel pesce non è sufficiente perché la concentrazione nei mangimi consenta di raggiungere una concentrazione nel pesce sufficientemente elevata per analizzare una diminuzione di almeno un ordine di grandezza durante la depurazione, a causa della scarsa sensibilità del metodo di analisi o di un'efficienza di assimilazione troppo bassa. In tal caso, può essere utile protrarre la fase iniziale di alimentazione oltre i 14 giorni o, soprattutto nel caso di sostanze ad elevata metabolizzazione, prevedere una concentrazione maggiore nella dieta. Occorre tuttavia mantenere il carico corporeo durante l'assorbimento al di sotto della concentrazione senza effetti osservati (NOEC) cronica (stimata) nei tessuti del pesce (cfr. paragrafo 138).

Durata della fase di depurazione

Di norma, la depurazione dura fino a 28 giorni ed inizia con la prima somministrazione ai pesci del gruppo di prova di mangimi puri, non addizionati, dopo la fase di assorbimento. La depurazione inizia con la prima razione non addizionata anziché dall'ultima razione addizionata, poiché il pesce continua a digerire gli alimenti e ad assorbire la sostanza in esame nel corso delle successive 24 ore, come indicato al paragrafo 126. Pertanto, il primo campione della fase di depurazione è prelevato immediatamente prima della seconda razione non addizionata. Tale periodo di depurazione è inteso a individuare le sostanze con un tempo di

▼M7

dimezzamento di 14 giorni, corrispondente alle caratteristiche delle sostanze bioaccumulabili, una prova della durata di 28 giorni comprende quindi due tempi di dimezzamento di tali sostanze ([1]). Con le sostanze fortemente bioaccumulabili, può essere utile estendere la fase di depurazione (se indicato dall'esame preliminare).

Se una sostanza è eliminata molto lentamente al punto che non si possa determinare un tempo di dimezzamento esatto durante la fase di depurazione, le informazioni ottenute possono comunque essere sufficienti ai fini della valutazione e indicare un livello elevato di bioaccumulo. Al contrario, se la sostanza è eliminata molto rapidamente al punto che non si può ottenere né alcuna concentrazione affidabile al tempo 0 (concentrazione alla fine della fase di assorbimento o all'inizio della fase di depurazione, $C_{0,d}$) né k_2, si può procedere a una stima prudente di k_2 (cfr. appendice 7).

Se le prime analisi dei pesci campionati (7 o 14 giorni) indicano che la sostanza in esame è stata eliminata al di sotto dei livelli di rilevabilità prima della fine del periodo completo di 28 giorni, si può annullare il campionamento successivo e interrompere la prova.

In alcuni casi non si constata alcun assorbimento misurabile della sostanza in esame alla fine del periodo di assorbimento (o con il secondo campione nella fase di depurazione). Se si può dimostrare che i) i criteri di validità di cui al paragrafo 113 sono soddisfatti, e che ii) tale scarso assorbimento non è dovuto ad un difetto della prova (ad esempio, durata di assorbimento insufficiente, tecnica di arricchimento inadeguata con scarsa biodisponibilità, sensibilità insufficiente del metodo d'analisi, mancato consumo dell'alimento da parte dei pesci, ecc.), è possibile porre fine allo studio senza dover ripetere la prova con una durata di assorbimento più lunga. Se lo studio preliminare indica che ciò possa essere il caso, può essere consigliabile, se possibile, analizzare le feci per esaminare la sostanza in esame non digerita secondo un approccio basato sul bilancio di massa.

Numero di pesci sperimentali

Come per la prova di esposizione attraverso l'ambiente acquatico, occorre scegliere pesci di peso e lunghezza simili e il più piccolo di essi non deve avere un peso inferiore a due terzi del pesce più grande (cfr. paragrafi da 40 a 42).

Il numero totale di pesci utilizzati per lo studio va stabilito in funzione del programma di campionamento (almeno un prelievo alla fine della fase di assorbimento e quattro o sei prelievi durante la fase di depurazione, secondo la durata di ciascuna fase). Occorre inoltre tenere conto della sensibilità della tecnica di analisi, la concentrazione che può essere raggiunta alla fine della fase di assorbimento (secondo le informazioni disponibili ex ante) e la durata della fase di depurazione (se le informazioni disponibili in precedenza ne consentono una stima). Occorre prelevare ogni volta tra cinque e dieci pesci e quantificarne la crescita (peso e lunghezza totale) prima dell'analisi chimica o del contenuto lipidico.

A causa della variabilità inevitabile delle dimensioni, della crescita e della fisiologia dei pesci e della quantità probabilmente variabile di cibo ingerita da ciascuno, è necessario prelevare per ciascun tempo di campionamento almeno cinque pesci di prova e cinque esemplari del gruppo di controllo per accertare in modo adeguato la concentrazione media e la relativa variabilità. La variabilità dei parametri nei pesci può incrementare la variabilità incontrollata complessiva della prova più di quanto dipenda dalla variabilità intrinseca dei metodi di analisi applicati, il che giustifica l'utilizzo, in alcuni casi, di un massimo di dieci esemplari per campionamento. Tuttavia, se i livelli di fondo delle concentrazioni della sostanza in esame nei pesci di controllo non sono misurabili all'inizio della fase di depurazione, l'analisi chimica di due o tre pesci di controllo nell'ultimo periodo di campionamento può essere sufficiente solo se si continua a campionare gli esemplari rimanenti del gruppo di controllo in funzione del loro peso e lunghezza totale (in modo da prelevare ogni volta lo stesso numero nei gruppi di prova e di controllo per tener conto della loro crescita). I pesci sono conservati, pesati individualmente (anche se successivamente si rende necessario combinare i risultati dei prelievi) e misurati (lunghezza totale).

([1]) Nel quadro di uno studio con esposizione attraverso l'ambiente acquatico, un tempo di dimezzamento di 14 giorni corrisponde a un fattore di bioconcentrazione di circa 10 000 l/kg utilizzando pesci di 1 g con un tasso di assorbimento di circa 500 l/kg/d [secondo l'equazione di Sijm et al. (46)].

▼M7

Pertanto, una prova tipo che prevede una fase di depurazione di 28 giorni e cinque prelievi richiederà un totale di 59-120 pesci nel gruppo di prova e tra 50 e 110 pesci nel gruppo di controllo, supponendo che la tecnica di analisi della sostanza consenta di analizzare il contenuto di grassi su uno stesso pesce. Se non è possibile analizzare la sostanza chimica e il tenore di lipidi sullo stesso pesce e non è nemmeno possibile utilizzare un pesce di controllo per analizzarne il contenuto di grassi (cfr. paragrafo 56), si devono aggiungere 15 esemplari (tre dallo stock di pesci all'inizio della prova, tre rispettivamente dal gruppo di controllo e dal gruppo di prova all'inizio della fase di depurazione e tre rispettivamente dal gruppo di controllo e dal gruppo di prova alla fine dell'esperimento). Un programma di campionamento con il numero dei pesci utilizzati è riportato nell'appendice 4.

Carico

Usare rapporti acqua/pesce altrettanto elevati di quelli utilizzati nel metodo di esposizione in ambiente acquatico (cfr. paragrafi 43 e 44). Sebbene i tassi di carico pesci/acqua non influiscano in alcun modo sulle concentrazioni di esposizione durante la prova, si raccomanda di applicare un tasso di carico compreso tra 0,1 e 1,0 g di pesce (peso umido) per litro d'acqua per giorno in modo da mantenere le concentrazioni di ossigeno disciolto e ridurre al minimo lo stress per gli organismi testati.

Dieta e somministrazione durante la prova

Durante il periodo di acclimatazione, i pesci ricevono un'alimentazione appropriata (cfr. paragrafo 117). Se la prova è eseguita con un sistema a flusso continuo, è opportuno interrompere il flusso al momento della somministrazione del cibo.

Durante la prova, l'alimentazione del gruppo di prova deve essere conforme ai criteri descritti in precedenza (cfr. paragrafi da 116 a 121). Oltre alle caratteristiche specifiche della sostanza in esame, della sensibilità del metodo di analisi, della concentrazione prevista nell'alimentazione in funzione delle condizioni ambientali e dei livelli di tossicità cronica/carico corporeo, occorre tener conto, nel definire la concentrazione di prova della sostanza, delle qualità organolettiche dei mangimi (di modo che i pesci non evitino di assumerli). La concentrazione nominale della sostanza in esame va indicata nella relazione sulla prova. In base all'esperienza, le concentrazioni comprese tra 1 e 1 000 μg/g offrono un intervallo operativo adeguato per valutare le sostanze che non presentano alcun meccanismo tossico specifico. Per quanto riguarda le sostanze che agiscono con un meccanismo non specifico, i livelli nei residui tissutali non dovrebbero essere superiori a 5 mol/g di grassi, altrimenti rischiano di provocare effetti cronici (19) (48) (50) ([1]). Per le altre sostanze, è opportuno assicurarsi che nessun effetto nocivo derivi dall'esposizione cumulata (cfr. paragrafo 127). Ciò vale in particolar modo se più sostanze sono testate congiuntamente (cfr. paragrafo 112).

La quantità adeguata della sostanza in esame può essere addizionata ai mangimi per pesci in tre modi (cfr. paragrafo 119 e appendice 7). I metodi e le procedure di arricchimento utilizzati vanno specificati nella relazione sulla prova. I pesci di controllo sono alimentati con mangimi non addizionati; nella fase di assorbimento, tali mangimi devono contenere la medesima quantità di olio eventualmente utilizzato come disperdente nel mangime addizionato oppure la stessa quantità di solvente «puro», se il solvente è stato utilizzato come disperdente nella preparazione del mangime addizionato da somministrare al gruppo di prova. È necessario analizzare almeno tre campioni della concentrazione della sostanza in esame nei mangimi, trattati e non trattati, prima dell'inizio e alla fine della fase di assorbimento. Dopo l'esposizione al regime addizionato (fase di assorbimento) i pesci (entrambi i gruppi) ricevono mangimi non trattati (fase di depurazione).

I pesci ricevano una razione alimentare determinata (a seconda della specie; circa 1-2 % del peso umido al giorno nel caso della trota iridata). L'esatta razione alimentare va determinata in modo da evitare una rapida crescita dei pesci e un forte aumento del tenore di grassi. È opportuno specificare nella relazione le dosi esatte somministrate per tutta la durata della prova. La prima razione si

([1]) Atteso che le concentrazioni interne reali possono essere determinate solo al termine della prova, è necessario stimare la concentrazione interna prevista (ad esempio tramite il BMF previsto e la concentrazione nel mangime; cfr. l'appendice 5 (A5.8).

▼M7

basa sul peso dello stock di pesce misurato appena prima dell'inizio della prova. La quantità di mangime deve essere adattata in funzione del peso umido dei pesci prelevati ai differenti tempi di campionamento previsti, per tener conto della loro crescita nel corso dell'esperimento. Il peso e la lunghezza dei pesci nelle vasche sperimentali e di controllo possono essere stimati in base al peso e alla lunghezza totale dei pesci di prova utilizzati in occasione di ogni campionamento; non pesare né misurare i pesci rimasti nelle vasche sperimentali e di controllo. È importante mantenere la medesima razione alimentare durante l'intero esperimento.

Occorre osservare l'alimentazione dei pesci per assicurarsi che i pesci consumino chiaramente tutto il mangime presentato in modo da garantire che i tassi di ingestione utilizzati nei calcoli siano corretti. Si considererà l'opportunità di eseguire esperimenti preliminari di somministrazione o di tener conto di esperienze precedenti nella scelta di un regime alimentare che garantisca che la razione giornaliera somministrata in un'unica soluzione viene totalmente consumata. Se una parte del mangime rimane sistematicamente non consumato, può essere opportuno ripartire la razione su un ulteriore periodo di somministrazione in ciascun giorno di esperimento (ad es. la stessa quantità giornaliera ma somministrata in due volte anziché una). Se ciò è necessario, la seconda somministrazione deve avvenire in un momento preciso, da stabilirsi in modo che intercorra il massimo tempo possibile prima del campionamento del pesce (ad esempio, la seconda razione viene somministrata nella prima metà del giorno di esperimento).

Sebbene in generale i pesci consumino rapidamente il cibo somministrato, è importante garantire che la sostanza in esame rimanga adsorbita negli alimenti. Occorre pertanto fare in modo che la sostanza in esame non si disperda in acqua, il che esporrebbe i pesci a concentrazioni della sostanza in esame nell'ambiente acquatico in aggiunta alla via alimentare. A tal fine, è opportuno eliminare il cibo non consumato (e le feci) dalle vasche sperimentali e di controllo entro un'ora o, di preferenza, entro 30 minuti dalla somministrazione. Inoltre, si può utilizzare un sistema di depurazione continua dell'acqua mediante un filtro a carbone, che adsorbe qualsiasi contaminante disciolto. I sistemi a flusso continuo possono contribuire a evacuare rapidamente le particelle alimentari e le sostanze sciolte ([1]). Talvolta, una leggera modifica della tecnica di arricchimento degli alimenti può contribuire ad attenuare il problema (cfr. paragrafo 119).

Illuminazione e temperatura

Per quanto riguarda il metodo di esposizione in ambiente acquatico (cfr. paragrafo 48) si raccomanda un fotoperiodo di 12-16 ore e una temperatura (± 2 °C) adeguata alla specie utilizzata (cfr. appendice 3). Tipo e caratteristiche dell'illuminazione devono essere noti e documentati.

Controlli

Occorre utilizzare un gruppo di controllo, alimentato con lo stesso mangime del gruppo di prova che però non contiene la sostanza in esame. Se per addizionare gli alimenti del gruppo di prova è stato utilizzato un olio o un solvente come disperdente, occorre trattare il cibo del gruppo di controllo esattamente allo stesso modo, ma senza l'aggiunta della sostanza in esame affinché l'alimentazione dei gruppi di prova e di controllo siano equivalenti (cfr. paragrafi 121 e 139).

([1]) La presenza della sostanza nel mezzo di prova attraverso le feci del pesce o a seguito di lisciviazione del cibo non può essere del tutto evitata. È possibile ad esempio misurare la concentrazione della sostanza presente nell'acqua alla fine della fase di assorbimento, soprattutto quando si utilizza un sistema semistatico, per stabilire se si è verificata un'esposizione in ambiente acquatico.

▼M7

Frequenza delle misurazioni della qualità dell'acqua

Le condizioni descritte per la prova di esposizione in ambiente acquatico si applicano anche in questo caso, ad eccezione del fatto che il carbonio organico totale è misurato solo prima della prova, al momento della caratterizzazione dell'acqua utilizzata per la prova (cfr. paragrafo 53).

Campionamento e analisi dei pesci e dell'alimentazione

Analisi dei campioni alimentari

Almeno tre campioni di cibo addizionato e non addizionato sono analizzati, per determinare la concentrazione della sostanza in esame e il contenuto di lipidi, almeno prima dell'inizio e alla fine della fase di assorbimento. I metodi di analisi e le procedure applicate per garantire l'omogeneità del regime alimentare vanno specificati nella relazione sulla prova.

Occorre analizzare la sostanza in esame nei campioni conformemente alla metodologia definita e convalidata. Si procede a uno studio per stabilire il limite di quantificazione, la percentuale di isolamento, le interferenze e la variabilità dell'analisi nella prevista matrice del campione. Se viene testata una sostanza radiomarcata, si dovranno fare considerazioni analoghe a quelle relative al metodo di esposizione in ambiente acquatico, nelle quali l'analisi degli alimenti sostituisce l'analisi dell'acqua (cfr. paragrafo 65).

Analisi dei pesci

Ad ogni campionamento si prelevano tra 5 e 10 esemplari in ciascuno dei gruppi di controllo e di prova (in alcuni casi il numero dei pesci di controllo può essere ridotto; cfr. paragrafo 134).

I campionamenti devono avvenire nello stesso momento in ciascun giorno di sperimentazione (in funzione del momento di somministrazione alimentare), e dovrebbe essere stabiliti in modo da ridurre la probabilità che il cibo rimanga nell'intestino durante la fase di assorbimento e l'inizio della fase di depurazione al fine di evitare di falsare le concentrazioni totali della sostanza in esame (cioè i pesci campionati vanno rimossi alla fine di un giorno sperimentale, tenendo presente che un giorno di sperimentazione inizia al momento della somministrazione di cibo e termina al momento della successiva alimentazione, circa 24 ore più tardi. La fase di depurazione inizia con la prima razione di cibo «non addizionato» (cfr. paragrafo 128). Il primo campione della fase di depurazione (prelevato immediatamente prima della seconda razione non addizionata) è importante in quanto serve a calcolare la concentrazione al tempo 0, mediante estrapolazione al giorno prima ($C_{0,d}$, la concentrazione nel pesce alla fine dell'assorbimento/all'inizio della depurazione). In alternativa, si possono prelevare e analizzare separatamente il tratto gastrointestinale del pesce alla fine dell'assorbimento e nei giorni 1 e 3 della fase di depurazione.

Per ciascun tempo di campionamento occorre prelevare i pesci dalle vasche sperimentali e di controllo e trattarli allo stesso modo descritto per il metodo di esposizione in ambiente acquatico (cfr. paragrafi da 61 a 63).

Misurare le concentrazioni della sostanza in esame nel pesce (peso umido) almeno alla fine della fase di assorbimento e durante la fase di depurazione nei gruppi di controllo e di prova. Durante la fase di depurazione, si raccomandano 4-6 tempi di campionamento (ad esempio nei giorni 1, 3, 7, 14 e 28). In alternativa, è possibile includere un tempo di campionamento supplementare dopo 1-3 giorni di assorbimento al fine dell'efficienza di assimilazione dalla fase lineare di assorbimento per i pesci mentre è ancora vicina all'inizio del periodo di esposizione. Esistono due principali deviazioni rispetto al programma: i) se si utilizza una proroga della fase di assorbimento ai fini dello studio della cinetica di assorbimento, ci saranno ulteriori tempi di campionamento durante la fase di assorbimento e di conseguenza dovrà essere incluso un numero maggiore di pesci (cfr. paragrafo 126); ii) se allo studio è stato posto termine alla fine della fase di assorbimento, a motivo della mancanza di assorbimento misurabile (cfr. paragrafo 131). Gli esemplari di pesci campionati sono pesati (e la loro lunghezza totale misurata) per determinare le costanti cinetiche di crescita. Possono essere misurate anche le concentrazioni della sostanza in specifici tessuti dei

▼M7

pesci (parti commestibili e non commestibili) alla fine della fase di assorbimento e in selezionati punti della fase di depurazione. Se viene testata una sostanza radiomarcata, si dovranno fare considerazioni analoghe a quelle relative al metodo di esposizione in ambiente acquatico, nelle quali l'analisi degli alimenti sostituisce l'analisi dell'acqua (cfr. paragrafo 65).

In caso di utilizzo periodico di una sostanza di riferimento (cfr. paragrafo 25), le concentrazioni vanno misurate di preferenza nel gruppo di prova alla fine dell'assorbimento e in tutti i tempi della depurazione specificati per la sostanza in esame (pesce intero); le concentrazioni nel gruppo di controllo vanno analizzate solo alla fine dell'assorbimento (pesce intero). In alcune circostanze (ad esempio quando le tecniche di analisi della sostanza in esame e della sostanza di riferimento sono incompatibili al punto che è necessario l'utilizzo di pesci supplementari per rispettare il programma di campionamento), si potrà applicare un metodo alternativo per ridurre al minimo il numero di esemplari supplementari necessari. Le concentrazioni della sostanza di riferimento sono misurate durante la fase di depurazione solo nei giorni 1, 3 e in due altri tempi di campionamento selezionati in modo da ottenere stime affidabili della concentrazione al tempo 0 ($C_{0,d}$) e del valore k_2 per la sostanza di riferimento.

Se possibile il contenuto lipidico di ciascun pesce dovrebbe essere determinato ad ogni campionamento, o almeno all'inizio e alla fine della fase di assorbimento e alla fine della fase di depurazione. (cfr. paragrafi 56 e 67). In funzione del metodo analitico utilizzato (cfr. paragrafo 67 e appendice 4), è possibile utilizzare gli stessi pesci per determinare il tenore di grassi e la concentrazione della sostanza in esame. Ciò è preferibile in quanto consente di ridurre al minimo il numero di esemplari necessari. Tuttavia, quando ciò non è possibile, occorre applicare il metodo descritto per il metodo di esposizione in ambiente acquatico (cfr. paragrafo 56 per le diverse opzioni di misurazione del tenore di grassi). Il metodo applicato per quantificare il tenore lipidico va registrato nella relazione sulla prova.

Qualità del metodo analitico

Sono necessarie prove preliminari per verificare la specificità, precisione e riproducibilità della tecnica di analisi specifica per la sostanza e l'isolamento della sostanza in esame nell'alimentazione e nel pesce.

Misurazione della crescita dei pesci

All'inizio della prova, occorre pesare e misurare un campione di pesce proveniente dallo stock ittico. I pesci sono prelevati poco prima (un'ora prima) della somministrazione del mangime addizionato e assegnati al giorno di prova 0. Il numero di animali sottoposti a campionamento deve essere uguale o superiore a quello dei pesci prelevati successivamente durante la prova. Alcuni di questi possono essere gli stessi pesci utilizzati per l'analisi dei lipidi eseguita prima dell'inizio della fase di assorbimento (cfr. paragrafo 153). In occasione di ciascun campionamento, i pesci sono pesati e misurati. Per ciascun esemplare, il peso e la lunghezza sono collegati alla concentrazione chimica analizzata (e eventualmente al tenore di grassi), ad esempio assegnando un codice di identificazione unico a ciascun pesce campionato. Tali misure possono servire a stimare il peso (e la lunghezza dei pesci rimasti nelle vasche di prova e di controllo.

Valutazione della prova

Le osservazioni relative alla mortalità devono essere registrate ogni giorno. Vanno effettuate ulteriori osservazioni per accertare eventuali effetti nocivi, ad esempio un comportamento anomalo o una pigmentazione, che devono essere registrati. I pesci sono considerati morti in assenza di movimenti respiratori o di reazione ad un leggero stimolo meccanico. Ogni esemplare morto o visibilmente morente dovrà essere rimosso.

▼M7

RELAZIONE SULLA PROVA E RISULTATI

Trattamento dei risultati

I risultati delle prove sono utilizzati per calcolare la costante cinetica di depurazione (k_2) in funzione del peso umido totale del pesce. La costante cinetica di crescita, k_g, basata sull'incremento medio del peso del pesce è calcolata e utilizzata per produrre la costante cinetica di depurazione corretta per la crescita, k_2g, se del caso. Si dovrebbe inoltre registrare l'efficienza di assimilazione (a; assunzione intestinale), il fattore di biomagnificazione cinetico (BMF_K) (se necessario corretto per la crescita, BMF_{Kg}), il suo valore corretto per i lipidi (BMF_{KL} o BMF_{KgL}, se corretto dall'effetto di diluizione dovuto alla crescita) e il regime alimentare. Inoltre, qualora sia possibile stimare il tempo necessario per raggiungere lo stato stazionario durante la fase di assorbimento (ad esempio 95 % dello stato stazionario o $t_{95} = 3{,}0/k_2$), si deve includere una stima del BMF allo stato stazionario (BMF_{SS}) (cfr. paragrafi 105 e 106 e appendice 5) se il valore t_{95} indica che lo stato stazionario è raggiunto. Occorre applicare al BMF_{SS} la stessa correzione per i lipidi applicata al BMF cinetico (BMF_K) per ottenere un valore corretto per il tenore di grassi, BMF_{SS} (non esiste alcuna procedura concordata per correggere un BMF allo stato stazionario dall'effetto di diluizione dovuto alla crescita). Le formule e gli esempi di calcolo sono illustrati nell'appendice 7. Diversi metodi consentono di calcolare un fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_K) a partire dai dati ottenuti nello studio per via alimentare. Essi sono riportati nell'appendice 8.

Peso e lunghezza dei pesci

Il peso umido e la lunghezza di ciascun pesce, a ciascun tempo di campionamento, sono presentati separatamente per i gruppi di prova e i gruppi di controllo durante la fase di assorbimento [(stock ittico all'inizio del periodo di assorbimento; gruppo di controllo e gruppo di prova alla fine del periodo di assorbimento e, se eseguite, la fase iniziale (ad esempio giorni 1-3 della fase di assorbimento) e la fase di depurazione (ad esempio giorni 1, 2, 4, 7, 14, 28, per il gruppo di prova e il gruppo di controllo)]. Il peso è la misura preferita per la crescita ai fini della correzione dall'effetto di diluizione dovuto alla crescita. I paragrafi 162 e 163 e l'appendice 5 presentano il metodo o i metodi utilizzati per la correzione.

Concentrazione della sostanza in esame nel pesce

Le misurazioni dei residui della sostanza in esame effettuate su ogni singolo pesce (o su campioni raggruppati se le singole misurazioni non sono possibili), espresse in termini di concentrazioni del peso umido (w/w), vengono presentate in tabelle, separatamente per ciascun punto di campionamento, per i gruppi di controllo e di prova. Se è stata effettuata un'analisi lipidica su ciascuno dei pesci prelevati, le concentrazioni individuali corrette per il tenore di grassi, espresse in tenore lipidico del pesce umido (w/w lipid), possono essere calcolate e registrate.

— Le misurazioni dei residui della sostanza in esame effettuate su ogni singolo pesce (o su campioni raggruppati se le singole misurazioni non sono possibili, cfr. paragrafo 66) per la fase di depurazione sono trasformate nei loro logaritmi naturali e presentate graficamente in funzione del tempo (giorno). Se sul tracciato si osservano evidenti valori anomali, si può applicare un test statisticamente valido ai valori anomali al fine di eliminare i punti corrispondenti ai dati anomali, la cui omissione dovrà essere debitamente giustificata.

— Una correlazione lineare dei minimi quadrati è calcolata per i dati relativi al logaritmo naturale della concentrazione in funzione del tempo (giorno) di depurazione. La pendenza e intercetta della linea sono registrate come la costante cinetica di depurazione complessiva (k_2) e il logaritmo naturale della concentrazione ottenuto al tempo 0 ($C_{0,d}$) (cfr. appendice 5 e appendice 7 per ulteriori dettagli). Se ciò non è possibile perché le concentrazioni sono inferiori al limite di quantificazione per il secondo campione della fase di depurazione, si può procedere ad una stima prudente di k_2 (cfr. appendice 7).

— Le differenze della pendenza e intercetta della linea sono calcolate utilizzando le tecniche statistiche standard, e gli intervalli di confidenza del 90 % (o del 95 %) di tali risultati sono valutati e presentati.

▼M7

— La concentrazione media misurata nel pesce l'ultimo giorno della fase di assorbimento (concentrazione misurata al giorno 0, $C_{0,m}$) è calcolata e confrontata con il valore derivato $C_{0,d}$. Se il valore derivato è inferiore al valore misurato, la differenza può indicare la presenza, nell'intestino dei pesci, di cibo addizionato non digerito. Se il valore derivato è notevolmente superiore al valore misurato, ciò può significare che il valore derivato della regressione lineare dei dati di depurazione è errato e dovrebbe essere rivalutato (cfr. appendice 7).

Velocità di depurazione e fattore di biomagnificazione

Per calcolare il fattore di biomagnificazione, occorre innanzitutto ottenere l'efficienza di assimilazione (assorbimento della sostanza in esame per via intestinale, α). A tal fine, è opportuno applicare l'equazione A7.1 dell'appendice 7 che richiede la conoscenza della concentrazione nel pesce ottenuta al giorno 0 della fase di depurazione ($C_{0,d}$), la costante cinetica di depurazione (globale) (k_2), la concentrazione negli alimenti (C_{food}), la costante cinetica di ingestione (I) e la durata della fase di assorbimento (t). La pendenza e l'intercetta della relazione lineare tra il logaritmo naturale della concentrazione e il tempo di depurazione sono registrate come la costante cinetica di depurazione complessiva (k_2 = pendenza) e la concentrazione al tempo 0 ($C_{0,d} = e^{intercept}$), come indicato in precedenza. Occorre verificare la plausibilità biologica dei valori ottenuti (ad esempio, l'efficienza di assimilazione sotto forma di percentuale non è superiore a 1). *(I)* è calcolata dividendo la massa degli alimenti per il peso del pesce alimentato ogni giorno (se alimentato al 2 % del suo peso (I) è pari a 0,02). Tuttavia può rendersi necessario adeguare il regime alimentare utilizzato nei calcoli in funzione della crescita degli esemplari (utilizzando la costante cinetica di crescita per stimare il peso del pesce ad ogni campionamento durante la fase di assorbimento; cfr. appendice 7). Nei casi in cui non è possibile ottenere k_2 e $C_{0,d}$ perché, ad esempio, le concentrazioni sono scese al di sotto della soglia di rilevamento al momento del secondo campione di depurazione, si può procedere ad una stima prudente di k_2 e si può calcolare un «limite superiore» di BMF_k (cfr. appendice 7)

Una volta ottenuta l'efficienza di assimilazione (α) si può calcolare il fattore di biomagnificazione moltiplicando α per la costante cinetica di ingestione (I) e dividendola per la costante cinetica di depurazione (globale) (k_2). Il fattore di biomagnificazione corretto dall'effetto di diluizione dovuto alla crescita è calcolato nello stesso modo, ma utilizzando la costante cinetica di depurazione corretta per la crescita (k_{2g}; cfr. paragrafi 162 e 163). In alternativa, è possibile stimare l'efficienza di assimilazione se sono stati analizzati i tessuti dei pesci prelevati nel corso della fase iniziale, lineare dell'assorbimento (cfr. paragrafo 151 e appendice 7). Tale valore rappresenta una stima indipendente dell'efficienza di assimilazione per un organismo praticamente non esposto (vale a dire il pesce prelevato all'inizio della fase di assorbimento). L'efficienza di assimilazione stimata sulla base dei dati della fase di depurazione è solitamente utilizzata per ottenere il BMF.

Correzione per il tenore di grassi e correzione dalla diluizione dovuta alla crescita

La crescita dei pesci durante la fase di depurazione può ridurre le concentrazioni chimiche misurate nel pesce, aumentando la costante cinetica di depurazione complessiva, k_2, più di quanto provocherebbero i soli processi di depurazione (es.: metabolismo, egestione) (cfr. paragrafo 72). Il contenuto di liquidi nel pesce di prova (fortemente associato al bioaccumulo delle sostanze chimiche idrofobe) e il contenuto di lipidi degli alimenti possono variare in pratica sufficientemente per richiederne la correzione al fine di ottenere fattori di biomagnificazione significativi. Il fattore di biomagnificazione è corretto dall'effetto di diluizione dovuto alla crescita (come il BCF cinetico nel metodo di esposizione in ambiente acquatico) e corretto per il tenore lipidico degli alimenti in funzione di quello del pesce (il fattore di correzione per i lipidi). Le appendici 5 e 7 presentano le equazioni e forniscono esempi di calcoli di questo tipo.

Per correggere la diluizione della crescita, si deve calcolare la costante cinetica di depurazione corretta per la crescita (k_{2g}) (cfr. appendice 5 per le formule). La costante cinetica di depurazione corretta (k_{2g}) è utilizzata per calcolare il fattore

▼M7

di biomagnificazione corretto per la crescita, come indicato al paragrafo 73. In alcuni casi, tale metodo non è possibile. Un altro metodo che evita la necessità di una correzione della diluizione dovuto alla crescita consiste nell'utilizzare la massa della sostanza in esame per pesce (intero) della depurazione anziché la normale massa della sostanza in esame per unità di massa del pesce (concentrazione). Ciò è facilmente calcolabile, poiché le prove che rispettano il presente metodo devono collegare le concentrazioni registrate nei tessuti al peso del singolo pesce. L'appendice 5 illustra la procedura di calcolo semplice. Si noti che il ricorso a tale metodo alternativo non esonera dalla valutazione e dalla registrazione del valore di k_2.

Per correggere per il tenore lipidico degli alimenti e del pesce quando l'analisi lipidica non è stata effettuata su tutti i pesci campionati, si calcolano le parti grasse medie (del pesce umido) nel pesce e nei mangimi ([1]). Il fattore di correzione per il tenore di grassi (L_c) è calcolato dividendo la parte grassa media del pesce per la parte grassa media di alimenti. Il fattore di biomagnificazione, corretto per la crescita, è diviso per il fattore di correzione per il tenore di grassi al fine di calcolare il fattore di biomagnificazione corretto per i lipidi.

Se l'analisi chimica e l'analisi dei lipidi sono state condotte sullo stesso pesce allo stesso tempo di campionamento è opportuno utilizzare questi dati corretti per i lipidi sui tessuti dei singoli pesci al fine di calcolare direttamente un BMF corretto per i lipidi [cfr. (37)]. La curva della concentrazione corretta in funzione dei lipidi dà $C_{0,d}$ e k_2. Si può procedere ad un'analisi matematica utilizzando le equazioni nell'appendice 7, ma l'efficienza di assimilazione è calcolata utilizzando la costante cinetica di ingestione normalizzata per il tenore lipidico (I_{lipid}) e la concentrazione nell'alimentazione in funzione dei lipidi ($C_{\text{food-lipid}}$). I parametri corretti per il tenore di grassi sono poi impiegati in modo analogo per calcolare il BMF (per calcolare il BMF_{KgL} corretto per il tenore di grassi e per la crescita, si applica anche la correzione della costante cinetica di crescita alla parte grassa anziché al peso del pesce umido).

Interpretazione dei risultati

La crescita media del gruppo di prova e del gruppo di controllo non dovrebbe in linea di principio differire molto per escludere effetti tossici. Le costanti cinetiche di crescita o le curve di crescita dei due gruppi vanno confrontate mediante una procedura adeguata ([2]).

Relazione sulla prova

Dopo il completamento dello studio, occorre redigere una relazione finale contenente le informazioni sulla sostanza in esame, la specie utilizzata e le condizioni di prova di cui al paragrafo 81 (per il metodo di esposizione in ambiente acquatico). Inoltre, la relazione deve includere anche le seguenti informazioni:

Sostanza in esame:

— Tutte le informazioni sulla stabilità della sostanza in esame negli alimenti preparati;

([1]) Questo metodo è specifico per lo studio basato sull'alimentazione e differisce dalla procedura seguita per l'esposizione in ambiente acquatico. Per tale motivo è stato usato il termine «correzione» anziché «normalizzazione» onde evitare confusione — cfr. la nota n. 34.

([2]) Si può eseguire un test t per le costanti cinetiche di crescita, per verificare se la crescita tra i gruppi di controllo e di prova varia, o un test F in caso dell'analisi della varianza. Se necessario, si può utilizzare un test F o test del rapporto di verosimiglianza per facilitare la scelta del modello di crescita adeguato [monografia OCSE n. 54 (32)].

▼M7

Condizioni sperimentali:

— La concentrazione nominale della sostanza negli alimenti, la tecnica di arricchimento utilizzata, il quantitativo di mezzo disperdente (lipidi) utilizzato per tale arricchimento (se utilizzato), le concentrazioni della sostanza in esame nell'alimento addizionato per ciascuna analisi (almeno tre campioni prima dell'inizio e alla fine della fase di assorbimento) e i valori medi;

— se utilizzato, il tipo e la qualità dell'olio o del solvente (grado, fabbricante, ecc.) utilizzato per l'arricchimento;

— il tipo di mangime utilizzato (analisi immediata [1]), grado o qualità, fornitore, ecc.), il tasso di somministrazione durante la fase di assorbimento, la quantità di cibo somministrata e la frequenza (compresi gli aggiustamenti in funzione del peso del pesce campionato);

— il momento in cui i pesci sono stati prelevati e soppressi in modo non cruento ai fini dell'analisi chimica di ciascun tempo di campionamento (ad esempio un'ora prima della somministrazione della razione del giorno successivo);

Risultati:

— risultati di eventuali studi preliminari;

— informazioni su eventuali effetti nocivi osservati;

— descrizione completa di tutti i metodi di analisi chimica utilizzati, compreso il limite di rilevabilità e di quantificazione, la variabilità e l'isolamento della sostanza;

— concentrazioni lipidiche misurate negli alimenti (di controllo e addizionati), valori individuali, medie e deviazioni standard;

— tabella del peso (e lunghezze) di ciascun pesce dei gruppi di controllo e di trattamento (ad esempio attribuendo un identificatore unico a ciascun pesce campionato) e calcoli, costante o costanti cinetiche di crescita ottenute e intervallo di confidenza del 95 %;

— tabella delle concentrazioni della sostanza in esame nei pesci, concentrazioni medie misurate alla fine dell'assorbimento ($C_{0,m}$), e costante cinetica di depurazione (globale) ottenuta (k_2) e concentrazione nel pesce all'inizio della fase di depurazione ($C_{0,d}$), nonché le differenze di tali valori (pendenza e intercetta);

— tabella dei tenori lipidici nei pesci (se del caso, con un corrispondente elenco delle concentrazioni specifiche della sostanza), valori medi per i gruppi di controllo e di prova all'inizio della prova, alla fine della fase di assorbimento e alla fine della fase di depurazione;

— curve (comprendenti tutti i dati misurati) con indicazione dei seguenti dati (se del caso, le concentrazioni possono essere espresse per l'animale intero o tessuti specificati dello stesso):

  — la crescita (cioè peso (e lunghezza) del pesce in funzione del tempo) o il peso trasformato in logaritmo naturale in funzione del tempo;

[1] Tecnica di analisi degli alimenti per verificare il tenore di proteine, lipidi, in cellulosa e ceneri. Tali informazioni sono di solito disponibili presso il fornitore.

▼M7

— la depurazione nel pesce della sostanza in esame; e

— la concentrazione trasformata in logaritmo naturale (ln concentrazione) in funzione del tempo di depurazione (ivi compresa la costante cinetica di depurazione ottenuta, k_2, e la concentrazione nel pesce ottenuta dal logaritmo naturale all'inizio della fase di depurazione, $C_{0,d}$).

— Se sul tracciato si osservano evidenti valori anomali, si può applicare un test per outlier statisticamente valido al fine di eliminare i punti corrispondenti ai dati anomali, la cui omissione dovrà essere debitamente giustificata.

— Costante cinetica di depurazione calcolata e tempo di dimezzamento corretti per la crescita.

— Efficienza di assimilazione calcolata (α).

— BMF per via alimentare «grezzo», BMF cinetico corretto per i lipidi e per la crescita («grezzo» e corretto per i lipidi in funzione del peso umido totale del pesce), BMF specifico per specifici tessuti, se applicabile.

— Informazioni relative ai metaboliti della sostanza radiomarcata in esame e relativo accumulo.

— Eventuali anomalie concernenti la prova, eventuali deviazioni dalle procedure descritte e ogni altra informazione pertinente;

— Una tabella riepilogativa dei pertinenti dati misurati e calcolati, come di seguito:

Costanti cinetiche di depurazione della sostanza e fattori di biomagnificazione (BMF_K)	
k_g (costante cinetica di crescita; giorno^{-1}):	Inserire il valore (95 % CI) (1)
k_2 (costante cinetica di depurazione complessiva, giorno^{-1}):	Inserire il valore (95 % CI)
k_{2g} (costante cinetica di depurazione corretta per la crescita; giorno^{-1}):	Inserire il valore (95 % CI) (1)
$C_{0,m}$ (concentrazione misurata al giorno 0, concentrazione nel pesce alla fine dell'assorbimento) (µg /g):	Inserire il valore ± SD (2)
$C_{0,d}$ (concentrazione ottenuta al giorno 0 della fase di depurazione; µg/g):	Inserire il valore ± SD (2)
I (tasso di ingestione fisso; g di cibo/ g di pesce/giorno):	Inserire il valore
I_g (razione alimentare effettiva, corretta per la crescita; g di cibo/ g pesce/giorno) (2)	Inserire il valore ± SD (2)
C_{food} (concentrazione della sostanza chimica negli alimenti; µg/g):	Inserire il valore ± SD (2)
α (efficienza di assimilazione della sostanza):	Inserire il valore ± SD (2)
BMF_K (BMF alimentare, cinetico):	Inserire il valore (95 % CI) (1)
BMF_{Kg} (BMF alimentare, cinetico, corretto per la crescita):	Inserire il valore (95 % CI) (1)

▼M7

Costanti cinetiche di depurazione della sostanza e fattori di biomagnificazione (BMF_K)	
$t_{1/2g}$ (tempo di dimezzamento corretto per la crescita, in giorni):	Inserire il valore ± SD ([2])
*L*c (fattore di correzione del tenore lipidico):	Inserire il valore
BMF_{KgL} (BMF cinetico, corretto per la crescita e per i tenore lipidico):	Inserire il valore
BMF_{SS-L} (BMF allo stato stazionario indicativo corretto per il tenore lipidico) ([2]):	Inserire il valore ± SD ([2])

([1]) CI: intervallo di confidenza (se possibile stimarlo)
([2]) SD: Deviazione standard (se possibile stimarla)

BIBLIOGRAFIA

(1) Capitolo C.13 del presente allegato, Bioconcentrazione: *Saggio sui pesci, metodo a flusso continuo.*

(2) Capitolo A.6 del presente allegato, Idrosolubilità.

(3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. Environ Toxicol Chem 12: 2031-2035

(4) Capitolo A.8 del presente allegato, Coefficiente di ripartizione (n-ottanolo/acqua): *Metodo del dibattimento in pallone.*

(5) Capitolo A.24 del presente allegato, Coefficiente di ripartizione (n-ottanolo/acqua): Metodo per HPLC.

(6) Capitolo A.23 del presente allegato, Coefficiente di ripartizione (1- ottanolo/acqua): *Metodo dell'agitazione lenta.*

(7) Capitolo C.7 del presente allegato, Idrolisi in funzione del pH.

(8) (OCSE (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment N. 7: Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water OCDE/GD(97)21. Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico (OCSE), Parigi, Francia.

(9) Capitolo A.5 del presente allegato, Tensione superficiale di soluzioni acquose.

(10) Capitolo A.4. del presente allegato, Tensione di vapore.

(11) Capitolo C.4 del presente allegato, Pronta biodegradabilità.

(12) Capitolo C.29 del presente allegato, Pronta biodegradabilità — CO_2 in recipienti ermetici.

(13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Recfr. Environ. Contam. Toxicol. 102: 117-156.

(14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

(15) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

▼M7

(16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35: 4097-4102.

(17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelletized fish food. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2058-2062.

(18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2′, 5,5′-tetrachlorobiphenyl. Toxicol. Sci. 77: 206-218.

(19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating in vivo fish bioaccumulation data. Integr. Environ. Assess. Manag. 4: 139-155.

(20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2436-2448.

(21) Schlechtriem C., Fliedner A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. Environmental Sciences Europe 2012, 24:13. published: 3 April 2012.

(22) Capitolo C.47 del presente allegato, Prova di tossicità sui pesci nei primi stadi di vita.

(23) Capitolo C.15 del presente allegato, Pesci, prova di tossicità a breve termine sugli stadi di embrione e di larve con sacco vitellino.

(24) Capitolo C.14 del presente allegato, Test sulla crescita del novellame.

(25) OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

(26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.

(27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.

(28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA

(29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.

(30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. Limnol. Oceanogr. 30: 1099-1105.

(31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. Analyst. 124: 1711-1718.

(32) OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO(2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

(33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

(34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.

(35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

(36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.

(37) Fisk A.T., Cymbalisty C.D., Bergman Ã. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C_{12}- and C_{16}-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem. 15: 1775-1782.

(38) Anonymous (2004), Fish, dietary bioaccumulation study — Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(39) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, Toxicol. Environ. Chem. 7: 173-189.

(41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. Chemosphere. 14: 829-833.

(42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

(43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. Toxicol. Sci. 77: 219-229.

(44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

(45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. Environ. Sci. Technol. 29: 2769-2777.

(46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined in vivo and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. Environ. Toxicol. Chem. 17: 951-961.

(48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2503-2517.

(49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.

▼**M7**

(50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. Environ. Sci. Technol. 27: 1718-1728.

(51) OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I — Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II — Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO(2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

Appendice 1

DEFINIZIONI E UNITÀ DI MISURA

L'efficienza di assimilazione (α) misura la percentuale di sostanza assorbita nell'organismo attraverso l'intestino (α non ha unità di misura, ma spesso è espresso in percentuale anziché in frazione).

Il bioaccumulo si riferisce generalmente a un processo in cui la concentrazione della sostanza in un organismo raggiunge un livello superiore a quello riscontrato nell'ambiente circostante (ad esempio, l'acqua per un pesce o l'aria per un mammifero), nella dieta, o entrambi (1).

La bioconcentrazione è l'aumento di concentrazione della sostanza in esame in o su un organismo (o suoi tessuti specificati) rispetto alla concentrazione della sostanza in esame nell'ambiente circostante.

Il fattore di bioconcentrazione (BCF o K_B) in qualsiasi momento della fase di assorbimento di questo saggio di accumulo è la concentrazione della sostanza in esame nel o sul pesce o suoi tessuti specificati (C_f in mg/kg) divisa per la concentrazione della sostanza in esame nell'ambiente circostante (C_w in mg/l). Il BCF è espresso in $l \cdot kg^{-1}$. Si noti che le correzioni per la crescita e/o per il contenuto lipidico non sono prese in considerazione.

La biomagnificazione è l' aumento di concentrazione della sostanza in esame in o su un organismo (o suoi tessuti specificati) rispetto alla concentrazione della sostanza in esame negli alimenti.

Il fattore di biomagnificazione (BMF) è la concentrazione di una sostanza in un predatore rispetto alla concentrazione nella preda (o nell'alimento) allo stato stazionario. Il metodo descritto nel presente metodo di prova evita attentamente l'esposizione attraverso l'ambiente acquatico Di conseguenza, il BMF ottenuto con tale metodo di prova non è direttamente comparabile con un BMF ottenuto in uno studio sul campo (che consente una combinazione di esposizione in ambiente acquatico e per via alimentare).

Il fattore di biomagnificazione per via alimentare (BMF per via alimentare) è il termine utilizzato nel presente metodo di prova per descrivere il risultato della prova di esposizione per via alimentare, in cui si evita accuratamente l'esposizione per l'ambiente acquatico; il BMF per via alimentare ottenuto con tale metodo non è direttamente comparabile con un BMF ottenuto in uno studio sul campo (che consente una combinazione di esposizione in ambiente acquatico e per via alimentare).

La fase post-esposizione o di depurazione (perdita) è il periodo, successivo al trasferimento del pesce di prova da un ambiente contenente la sostanza in esame ad un ambiente privo di tale sostanza, durante il quale si studia l'eliminazione (o perdita netta) della sostanza dal pesce di prova (o suo tessuto specificato).

La costante cinetica di depurazione (perdita) (k_2) è il valore numerico che definisce la velocità di riduzione della concentrazione della sostanza in esame nel pesce di prova (o suoi tessuti specificati) dopo il trasferimento del pesce di prova da un ambiente contenente la sostanza in esame ad un ambiente privo di tale sostanza (k_2 è espresso in $giorni^{-1}$).

Il carbonio organico disciolto (DOC) è una misura della concentrazione del carbonio proveniente da fonti organiche disciolte nel mezzo di prova.

La fase di esposizione o assorbimento è il periodo durante il quale i pesci sono esposti alla sostanza in esame.

Il tasso di ingestione alimentare (I) corrisponde alla quantità media di cibo consumato da ciascun pesce ogni giorno, rispetto al peso medio totale stimato del pesce (espresso in g di cibo/g di pesce/giorno).

▼M7

Il fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_K) è il rapporto tra la costante cinetica di assorbimento (k_1) e la costante cinetica di depurazione (k_2 (*i.e.* k_1/k_2 _ cfr. le corrispondenti definizioni nella presente appendice). In linea di principio il valore dovrebbe essere comparabile al BCF_{SS} (cfr. la definizione infra), ma sono possibili differenze se lo stato stazionario era incerto o se al BCF cinetico sono state applicate le correzioni per la crescita).

Il fattore di bioconcentrazione cinetico normalizzato in funzione dei lipidi ($BCF_{K\ L}$) è normalizzato rispetto a un pesce con un contenuto di grassi del 5 %.

Il fattore di bioconcentrazione cinetico corretto per la crescita e normalizzato in funzione dei lipidi ($BCF_{K\ gL}$) è normalizzato rispetto a un pesce con un contenuto di grassi del 5 % e corretto per la crescita durante il periodo sperimentale, come descritto nell'appendice 5.

Il fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario normalizzato in funzione dei lipidi (BCF_{SSL}) è normalizzato rispetto a un pesce con un contenuto di grassi del 5 %

Una sostanza multi-componenti è definita ai fini del regolamento REACH come una sostanza che presenta più di un componente principale in concentrazione compresa tra il 10 % e l'80 % (p/p).

Il coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua (K_{OW}) è il rapporto della solubilità di una sostanza in *n*-ottanolo e in acqua in condizioni di equilibrio [Metodi A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)]; è inoltre espresso come P_{OW}. Il logaritmo di K_{OW} viene usato come indicazione del potenziale di bioconcentrazione di una sostanza da parte di organismi acquatici.

Il carbonio organico particolato (POC) è una misura della concentrazione di carbonio proveniente da fonti organiche sospese nel mezzo.

La microestrazione in fase solida (SPME) è una tecnica analitica che non utilizza solventi sviluppata per sistemi diluiti. In questo metodo una fibra polimerica rivestita è esposta alla fase gassosa o liquida contenente l'analita di interesse. In generale, è imposto un tempo minimo di analisi affinché siano stabilite le condizioni di equilibrio tra le fasi solida e liquida, con riferimento alle specie esaminate. Successivamente, la concentrazione dell'analita di interesse può essere determinata direttamente dalla fibra o dopo averlo estratto dalla fibra con un solvente, a seconda della tecnica di determinazione utilizzata.

Nella rappresentazione grafica della concentrazione della sostanza in esame nei pesci (C_f) in funzione del tempo, lo stato stazionario viene raggiunto quando la curva diventa parallela all'asse del tempo e tre analisi successive di C_f su campioni prelevati ad intervalli di almeno due giorni danno valori che si collocano entro ± 20 % uno dall'altro, e non vi è alcun aumento significativo di C_f nel periodo di tempo trascorso tra la prima e l'ultima analisi successive. Quando si analizzano campioni raggruppati, sono necessarie almeno quattro analisi successive. Per il controllo di sostanze che vengono assorbite lentamente saranno più opportuni intervalli di sette giorni.

Il fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario (BCF_{SS}) non cambia in modo significativo su un periodo di tempo prolungato, giacché la concentrazione della sostanza in esame nell'ambiente circostante rimane costante durante tale periodo di tempo (cfr. la definizione di stato stazionario).

Il carbonio organico totale (TOC) misura la concentrazione di carbonio proveniente da tutte le fonti organiche nel mezzo di prova, comprese le fonti di particolato e aerosol.

La costante cinetica di assorbimento (k_1) è il valore numerico che definisce la velocità di aumento della concentrazione della sostanza in esame nel o sul pesce di prova (o suoi tessuti specificati) quando il pesce viene esposto a tale sostanza (k_1 è espresso in l giorni^{-1} kg^{-1}).

Le sostanze di composizione sconosciuta o variabile, i prodotti di una reazione complessa e i materiali biologici sono noti come UVCB.

▼**M7**

Una sostanza chimica è una sostanza o una miscela.

Una sostanza chimica in esame è qualsiasi sostanza o miscela saggiata seguendo il presente metodo di prova.

BIBLIOGRAFIA

(1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

(2) Capitolo A.8 del presente allegato, Coefficiente di ripartizione (n-ottanolo/acqua): *Metodo del dibattimento in pallone.*

(3) Capitolo A.24 del presente allegato, Coefficiente di ripartizione (n-ottanolo/acqua): Metodo per HPLC.

(4) Capitolo A.23 del presente allegato, Coefficiente di ripartizione (1- ottanolo/acqua): *Metodo dell'agitazione lenta.*

▼M7

Appendice 2

ALCUNE CARATTERISTICHE CHIMICHE DI UN'ACQUA DI DILUIZIONE ACCETTABILE

Componente	Concentrazione limite
Particolato	5 mg/l
Carbonio organico totale	2 mg/l
Ammoniaca non ionizzata	1 µg/l
Cloro residuo	10 µg/l
Pesticidi organofosforati totali	50 µg/l
Pesticidi organoclorurati totali più difenili policlorurati	50 µg/l
Cloro organico totale	25 µg/l
Alluminio	1 µg/l
Arsenico	1 µg/l
Cromo	1 µg/l
Cobalto	1 µg/l
Rame	1 µg/l
Ferro	1 µg/l
Piombo	1 µg/l
Nichel	1 µg/l
Zinco	1 µg/l
Cadmio	100 µg/l
Mercurio	100 µg/l
Argento	100 µg/l

▼M7

Appendice 3

SPECIE ITTICHE RACCOMANDATE PER LA PROVA

Specie raccomandata	Intervallo di temperatura raccomandato per la prova (°C)	Lunghezza totale raccomandata dell'animale di prova (cm) (2)
Danio rerio (1) (*Teleostei, Cyprinidae*) (Hamilton-Buchanan) Danio zebrato	20 — 25	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (*Teleostei, Cyprinidae*) (Rafinesque) Fathead minnow	20 — 25	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (*Teleostei, Cyprinidae*) (Linnaeus) Carpa commune	20 — 25	8,0 + 4,0 (3)
Orvzias latipes (*Teleostei, poecilliidae*) (Temminck e Schlegel) Medaka	20 — 25	4,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (*Teleostei, Poeciliidae*) (Peters) Guppy	20 — 25	3,0 ± 1,0
Menidia macrochirus (Teleostei centrarchidae) (Rafinesque) Bluegill	20 — 25	5,0 ± 2,0
Oncorhynchus mykiss (Teleostei salmonidi) (Walbaum) Trota iridea	13 — 17	8,0 ± 4,0
Gasterosteus aculeatus (Teleostei, (gasterosteidae) (Linnaeus) Spinarello	18 — 20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer et al. (1)

(2) Durante la prova stessa, è preferibile utilizzare il peso per misurare le derivazioni delle costanti cinetiche di crescita. Si riconosce tuttavia che la lunghezza è una misura più pratica se i pesci devono essere selezionati a vista all'inizio dell'esperimento (all'interno della popolazione dello stock ittico).

(3) Tale intervallo di lunghezze è riportato nel documento *Testing Methods for New Chemical Substances* ecc., basato sulla legislazione relativa al controllo delle sostanze chimiche del Giappone (CSCL).

Varie specie di estuario e marine sono meno utilizzate, ad esempio:

Corvina striata	(*Leiostomus xanthurus*)
Sheepshead minnow	(*Cyprinodon variegatus*)
Latterino	(*Menidia beryllina*)
Shiner perch	(*Cymatogaster aggregata*)
Sogliola limanda del Pacifico	(*Parophrys vetulus*)
Staghorn sculpin	(*Leptocottus armatus*)
Spinarello	(*Gasterosteus aculeatus*)
Spigola	(*Dicentracus labrax*)
Alborelle	(*Alburnus alburnus*)

▼**M7**

I pesci d'acqua dolce suelencati sono facilmente allevabili e/o sono largamente disponibili per tutto l'anno, mentre la disponibilità delle specie marine e di estuario è parzialmente confinata ai rispettivi paesi. Possono riprodursi e venire allevati sia in stabilimenti di acquicoltura sia in laboratorio, in condizioni di controllo delle malattie e dei parassiti, in modo che gli animali di prova siano sani e geneticamente controllati. Questi pesci sono disponibili in molte parti del mondo.

BIBLIOGRAFIA

(1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.

▼M7

Appendice 4

PROGRAMMA DI CAMPIONAMENTO PER LE PROVE DI ESPOSIZIONE PER VIA ALIMENTARE IN AMBIENTE ACQUATICO

1. **Esempio teorico di un programma di campionamento per una prova di bioconcentrazione con esposizione esclusivamente in ambiente acquatico su una sostanza con log ko/w = 4.**

Campionamento del pesce	Programma di campionamento		Numero di campioni d'acqua ([1])	Numero di pesci per campione ([1])
	Frequenza minima richiesta (giorni) ([2])	Campionamento supplementare (giorni) ([2])		
Fase di assorbimento				
1	-1		2 ([3])	4 ([4])
	0		(2)	(3 ([6]))
2	0,3		2	4
		0,4	(2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	(2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	(2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	(2)	(4)
6	4,7		2	4 – 8 ([5])
				(3 ([6]))
Fase di depurazione				Trasferire il pesce in acqua priva della sostanza in esame
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)
10	14,0		2	4 – 8 ([5])
		17,5		(4 + 3 ([6]))
TOTALE				40 – 72 (48 – 80) ([5])

([1]) I valori tra parentesi corrispondono al numero di campioni (acqua, pesce) da prelevare se si esegue un campionamento supplementare.

([2]) La stima preliminare di k_2 di una sostanza con log K_{ow} = 4.0 è di 0.652 giorni^{-1}. La durata totale dell'esperimento è impostata su $3 \times t_{SS} = 3 \times 4.6$, cioè 14 giorni. Per la stima di t_{SS} cfr. appendice 5.

([3]) Prelevare un campione di acqua dopo che è stato versato l'equivalente del volume di almeno tre recipienti di prova.

([4]) Questi pesci sono prelevati dallo stock ittico.

([5]) Se è necessaria una maggiore precisione su studi di metabolismo che richiedono un maggior numero di pesci, questi devono essere campionati specificamente alla fine delle fasi di assorbimento e di depurazione (cfr. paragrafo 40).

([6]) Almeno altri 3 pesci potranno essere necessari per analizzare il contenuto di grassi se non è possibile utilizzare i pesci prelevati per misurare le concentrazioni della sostanza in esame all'inizio della prova, alla fine della fase di assorbimento e alla fine della fase di depurazione. Nota dovrebbe essere possibile in molti casi utilizzare solo i 3 pesci di controllo (cfr. paragrafo 56).

▼M7

2. **Esempio teorico di un programma di campionamento per prova di bioaccumulo della sostanza per via alimentare con fasi di assorbimento e di depurazione, rispettivamente, di 10 e 42 giorni.**

Campionamento di pesci	Programma di campionamento		Numero di campioni di alimenti	Numero di pesci per campione	
	Giorno della fase	Ulteriori campioni di pesce?		Gruppo di prova	Gruppo di controllo
Fase di assorbimento					
1	0	Possibile (1) (2)	3 — gruppo di prova	0	5 — 10
			3 — gruppo di controllo (1)		(8 – 13) (2)
1A (3)	1-3			5 — 10	5 — 10
2	10	Si (4)	3 — gruppo di prova	10 — 15 (4)	5 — 10
			3 — gruppo di controllo (1)	(13 – 18) (5)	(8-13) (5)
Fase di depurazione					
3	1	Si (4)		10 — 15 (4)	5 — 10
4	2			5 — 10	5 — 10
5	4			5 — 10	5 — 10
6	7	Si (4)		10 — 15 (4)	5 — 10
7	14			5 — 10	5 — 10
8	28			5 — 10	5 — 10
9	42	Si (4)		10 — 15 (4) (13-18) (5)	5 — 10 (8-13) (5)
TOTALE				59 — 120 (63-126) (4) (5)	50 — 110 (56-116) (4) (5)

(1) Tre campioni di alimenti sia dei gruppi di controllo sia dei gruppi di prova sono analizzati per misurare le concentrazioni della sostanza in esame e il contenuto di lipidi.

(2) I pesci vengono prelevati a fini di campionamento dallo stock il più tardi possibile prima dell'inizio dello studio; almeno tre esemplari di tale stock sono prelevati all'inizio della prova per misurare il tenore di grassi.

(3) Il campionamento (facoltativo) all'inizio della fase di assorbimento fornisce i dati necessari per calcolare l'assimilazione della sostanza in esame consumata per via alimentare, che si può paragonare all' efficienza di assimilazione calcolata a partire dai dati ottenuti nel corso della fase di depurazione.

(4) Si possono prelevare cinque pesci supplementari per l'analisi dei tessuti specifici.

(5) Almeno tre esemplari supplementari potranno essere necessari per analizzare il contenuto di grassi se non è possibile utilizzare i pesci prelevati per misurare le concentrazioni della sostanza in esame all'inizio della prova, alla fine della fase di assorbimento e alla fine della fase di depurazione. È opportuno precisare che dovrebbe essere possibile in molti casi utilizzare solo i 3 pesci di controllo (cfr. paragrafi 56 e 153).

Nota relativa alla durata delle fasi e ai tempi di campionamento: la fase di assorbimento inizia con la prima razione di mangimi addizionati. Il primo giorno di prova inizia con la prima somministrazione di cibo e termina subito prima della successiva, 24 ore più tardi. Il primo campionamento (1 nella tabella) dovrebbe avvenire poco prima della somministrazione di cibo (un'ora prima, ad esempio). Idealmente, si dovrebbe ogni volta prelevare i pesci immediatamente prima della razione del giorno successivo (circa 23 ore dopo l'ultima razione). La fase di assorbimento termina subito prima della somministrazione di mangimi non addizionati, quando comincia la fase di depurazione (è probabile che i pesci del gruppo di prova stiano ancora digerendo gli alimenti addizionati nelle 24 ore dall'ultima somministrazione di mangime addizionato). Ciò significa che l'ultimo prelievo della fase di assorbimento avviene poco prima della somministrazione del mangime non addizionato, e il primo campionamento della fase di depurazione è eseguito circa 23 ore dopo la prima razione di mangimi non addizionati.

▼M7

Appendice 5

CALCOLI GENERALI

1. Introduzione

2. Previsione della durata della fase di assorbimento

3. Previsione della durata della fase di depurazione

4. Metodo sequenziale: determinazione della *costante cinetica* di depurazione (perdita) k_2

5. Metodo sequenziale: determinazione della costante cinetica di *assorbimento* k_1 (solo metodo di esposizione in ambiente acquatico)

6. Metodo di calcolo simultaneo delle costanti cinetiche di assorbimento e depurazione (perdita) (solo metodo di esposizione in ambiente acquatico)

7. Correzione per la diluizione causata dalla crescita per il BCF e il BMF cinetici

8. Normalizzazione dei grassi al 5 % del tenore di grassi (solo metodo di esposizione in ambiente acquatico)

1. INTRODUZIONE

Il modello generale di bioaccumulo in ambiente acquatico nei pesci può essere descritto in termini di processo di assorbimento e di perdita, ignorando l'assunzione alimentare. L'equazione differenziale (dC_f/dt) che descrive il tasso di variazione della concentrazione nel pesce (mg·kg^{-1}·giorno^{-1}) è data da (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \qquad \text{[equazione A5.1]}$$

Dove

k_1 = costante cinetica di primo ordine per l'assorbimento nei pesci (l· kg-1·giorno^{-1}).

k_2 = costante cinetica di primo ordine per la depurazione della sostanza nei pesci (giorni $^{-1}$).

kg = costante cinetica di primo ordine per la crescita del pesce (effetto di diluizione dovuto alla crescita) (giorno $^{-1}$)

km = costante cinetica di primo ordine per la trasformazione metabolica (giorno $^{-1}$)

ke = costante cinetica di primo ordine per l'egestione degli escrementi (giorno $^{-1}$)

Cw = concentrazione nell'acqua (mg· 1 $^{-1}$).

Cf = concentrazione nel pesce (mg· kg-1 di peso umido).

Per quanto riguarda sostanze bioaccumulabili, si può prevedere che un valore medio ponderato nel tempo (TWA) sia la concentrazione di esposizione nell'acqua (C_w) all'interno dell'intervallo di fluttuazione autorizzato (cfr. paragrafo 24). Si raccomanda di calcolare una media ponderata rispetto al tempo della concentrazione in acqua secondo le istruzioni fornite nell'appendice 6 del metodo di prova C.20 (2). Si noti che il logaritmo naturale della concentrazione in acqua è adeguato quando si prevede un declino esponenziale tra i periodi di rinnovo, ad esempio in condizioni di prova semistatiche. Con un sistema dinamico, la trasformazione in logaritmo naturale delle concentrazioni di esposizione non è sempre necessaria. Se si ottiene una media ponderata nel tempo della concentrazione in acqua, è opportuno registrarla e utilizzarla per i calcoli successivi.

In una prova BCF standard eseguita sui pesci, l'assorbimento e la depurazione possono essere descritti in termini di due processi cinetici di primo ordine.

▼M7

Cinetica di assorbimento = $k_1 \times C_w$ [equazione 5.2]

Cinetica di eliminazione globale =$(k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f$ [equazione A5.3]

Allo stato stazionario, in un'ipotesi di crescita e metabolismo trascurabili (i valori per kg e km non sono distinguibili da zero), la cinetica di assorbimento è uguale alla cinetica di depurazione, e quindi combinando le equazioni A5.2 e A5.3 si ottiene la seguente relazione:

$$BCF = \frac{C_{f\ -SS}}{C_{w\ -SS}} = \frac{k_1}{k_2}$$ [equazione A5.4]

Dove

$C_{f\text{-}SS}$ = concentrazione nel pesce allo stato stazionario (mg kg-1 di peso umido).

Cw-ss = concentrazione in acqua allo stato stazionario (mg L-1).

Il rapporto k_1/k_2 è noto come fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_k) e dovrebbe essere pari al valore del fattore di bioconcentrazione (BCF) allo stato stazionario (BCF_{SS}) ottenuto dal rapporto tra la concentrazione allo stato stazionario nel pesce e la concentrazione allo stato stazionario in acqua, ma variazioni sono possibili se lo stato stazionario è incerto o se correzioni per la crescita sono state applicate al BCF. Tuttavia, una volta che k_1 e k_2 sono costanti, non è necessario che venga raggiunto lo stato stazionario per ottenere un BCF_k.

Sulla base di queste equazioni di primo ordine, la presente appendice 5 riporta le operazioni generali di calcolo necessarie per i due metodi di bioaccumulo, con esposizione in ambiente acquatico e esposizione per via alimentare. Tuttavia, le sezioni 5, 6 e 8 sono rilevanti solo per il metodo di esposizione in ambiente acquatico, ma sono state qui riportate come «tecniche generali». I metodi sequenziali (sezioni 4 e 5) e simultaneo (sezione 6) permettono di calcolare le costanti di assorbimento e di depurazione che servono a ottenere i BCF cinetici. Il metodo sequenziale per calcolare k_2 (sezione 4) è importante per l'esposizione per via alimentare, in quanto necessario per calcolare l'efficienza di assimilazione e il BMF. L'appendice 7 illustra in dettaglio i calcoli specifici per il metodo di esposizione per via alimentare.

2. PREVISIONE DELLA DURATA DELLA FASE DI ASSORBIMENTO

Prima di eseguire la prova, si può ricavare una stima di k_2 e quindi di una data percentuale del tempo occorrente per arrivare allo stato stazionario da relazioni empiriche tra k_2 e il coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua (K_{ow}) o tra k_1 e il BCF. Si dovrebbe essere, tuttavia, consapevoli che le equazioni in questa sezione sono applicabili unicamente quando l'assorbimento e la depurazione seguano una cinetica di primo ordine. Se ciò non è evidentemente il caso, si raccomanda di chiedere il parere di un esperto in biostatistica e/o farmacocinetica, per stabilire se le previsioni della durata della fase di assorbimento sono auspicabili.

Una stima di k_2 (giorni-1) si può ottenere con diversi metodi. Ad esempio, le seguenti relazioni empiriche possono essere utilizzate in primo luogo: [1]

$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \log K_{OW}$ ($r^2 = 0{,}95$) [(3); Equazione A5.5]

oppure

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF}$$ [equazione A5.6]

Dove $k_1 = 520 \times W^{-0{,}32}$ (per le sostanze con log $K_{ow} > 3$) ($r^2 = 0{,}85$) [(4); equazione A5.7]

[1] Come per ogni relazione empirica, occorre verificare che la sostanza rientri nel campo di applicabilità della relazione.

▼M7

$$eBCF = 10^{(0{,}910 \cdot logK_{OW} - 1{,}975 \cdot log(6{,}8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0{,}786)} \qquad (r^2 = 0{,}90)$$ [(5) equazione A5.8]

W = media del peso del pesce trattato (in grammi di pesce umido) alla fine dell'assorbimento/inizio di depurazione ([1])

Per altre relazioni associate, cfr. (6). Può essere utile impiegare modelli più complessi per ricavare una stima di k_2 se, ad esempio, è probabile che si verifichi un metabolismo significativo (7) (8). Tuttavia, a causa della maggiore complessità del modello, si provvederà a prestare particolare attenzione all'interpretazione delle previsioni. Pertanto, la presenza di gruppi nitrici potrebbe indicare un metabolismo rapido, ma non è sempre questo il caso. Pertanto, l'utente deve ponderare i risultati con metodi predittivi sulla base della struttura chimica e ogni altra informazione pertinente (ad esempio studi preliminari) nella programmazione di uno studio.

Il tempo necessario per raggiungere una certa percentuale dello stato stazionario si può ricavare, applicando la stima k_2, dall'equazione cinetica generale che descrive l'assorbimento e la depurazione (cinetica di primo ordine), nell'ipotesi di crescita e metabolismo trascurabili. Se si verifica una crescita sostanziale nel corso dello studio, le stime indicate di seguito non saranno attendibili. In tale caso, è meglio utilizzare il valore k_2g corretto per la crescita come descritto più avanti (cfr. sezione 7 della presente appendice):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_f$$ [equazione A5.9]

o, se C è costante:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W (1 - e^{-k_2 t})$$ [equazione A5.10]

Approssimandosi allo stato stazionario, (t — ∞), l'equazione A5.10 può essere ridotta a (cfr. (9) (10)]:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W$$ [equazione A5.11]

oppure

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF$$ [equazione A5.12]

BCF × C_w è pertanto un'approssimazione della concentrazione nel pesce allo stato stazionario ($C_{f\text{-}SS}$). [Nota: Lo stesso approccio può essere usato per calcolare il BMF allo stato stazionario durante una prova con esposizione per via alimentare. In tal caso, il valore BCF è sostituito dal BMF, e la C_w dal C_{food}, la concentrazione negli alimenti, nelle equazioni di cui sopra.]

L'equazione A5.10 può essere riformulata come segue:

$$C_f = C_{f\ -SS}(1 - e^{-k_2 t})$$ [equazione A5.13]

oppure

$$\frac{C_f}{C_{f\ -SS}} = 1 - e^{-k_2 t}$$ [equazione A5.14]

Applicando l'equazione A5.14, il tempo necessario per raggiungere una certa percentuale dello stato stazionario si può prevedere quando k_2 sia stato pre-stimato mediante l'equazione A5.5 o A5.6.

A titolo indicativo, la durata statisticamente ottimale della fase di assorbimento per ottenere dati statisticamente accettabili (BCF_K) è il periodo necessario perché la curva del logaritmo della concentrazione della sostanza in esame nel pesce in funzione del tempo raggiunga almeno il 50 % dello stato

([1]) Il peso del pesce alla fine della fase di assorbimento può essere stimato sulla base dei dati di uno studio precedente o conoscenze sulla specie in esame, di cui è noto il probabile aumento delle dimensioni in base al peso all'inizio della prova abituale e per una durata di assorbimento abituale (ad es. 28 giorni).

▼M7

stazionario ($0.69/k_2$), e non più del 95 % dello stato stazionario ($3.0/k_2$) (11). Se l'accumulo supera il 95 % dello stato stazionario, il calcolo del BCF_{SS} diventa possibile.

Il tempo necessario per raggiungere l'80 % dello stato stazionario si ottiene da (equazione A5.14):

$$0{,}80 = 1 - e^{-k_2 t}$$ [equazione A5.15]

oppure

$$t_{80} = \frac{-\ln(0{,}20)}{k_2} = \frac{1{,}6}{k_2}$$ [equazione A5.16]

Analogamente il tempo necessario per raggiungere il 95 % dello stato stazionario si ottiene da:

$$t_{95} = \frac{-ln(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$ [equazione A5.17]

A titolo di esempio, la durata della fase di assorbimento (cioè il tempo necessario all'ottenimento di una certa percentuale dello stato stazionario, ad esempio t_{80} o t_{95}) di una sostanza in esame con log Ko/w = 4 raggiungerebbe (utilizzando le equazioni A5.5, A5.16 e A5.17):

$$logk_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \cdot 4$$

$k_2 = 0.652$ giorni-1

$$t_{80} = \frac{1{,}6}{0{,}652} = 2{,}45\text{giorni (59 ore)}$$

oppure $t_{95} = \frac{3{,}0}{0{,}652} = 4{,}60\text{giorni (110 ore)}$

In alternativa, si può utilizzare l'espressione:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55{,}31 \ (hours)$$ [equazione A5.18]

per calcolare il tempo affinché uno stato stazionario efficace ((t_{eSS}) possa essere raggiunto (12). Per una sostanza in esame con log K_{ow} = 4 ciò comporta, infatti:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10 - 3 \cdot 104 + 55{,}31 = 121 \text{ hours}$$

3. PREVISIONE DELLA DURATA DELLA FASE DI DEPURAZIONE

Una previsione del tempo necessario per ridurre il carico corporeo ad una certa percentuale della concentrazione iniziale si può ricavare anch'essa dall'equazione generale che descrive l'assorbimento e la depurazione (presupponendo una cinetica di primo ordine (cfr. equazione A5.9 (1) (13).

Per la fase di depurazione, si assume che C_w (o C_{food} per la prova di esposizione per via alimentare) sia pari a zero. L'equazione si può ridurre a:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f$$ [equazione A5.19]

oppure

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t}$$ [equazione A5.20]

dove $C_{f,0}$ è la concentrazione all'inizio del periodo di depurazione.

50 per cento di depurazione verrà allora raggiunta al tempo (t_{50}):

▼M7

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

oppure

$$t_{50} = \frac{-\ln(0{,}50)}{k_2} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

Analogamente il 95 % di depurazione verrà raggiunto a:

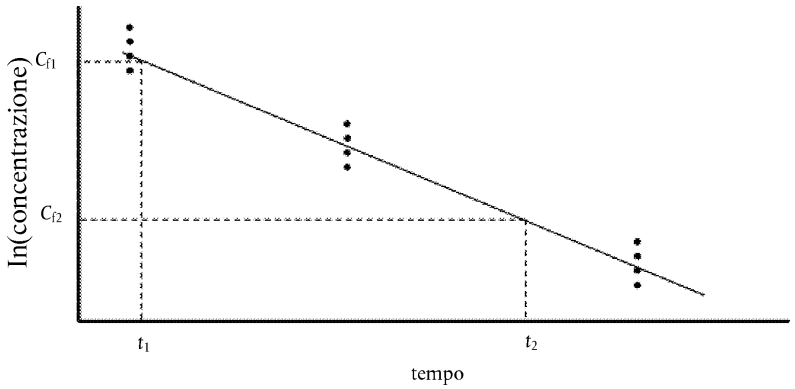
$$t_{95} = \frac{-\ln(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

Se si usa un assorbimento dell'80 % per il primo periodo ($1.6/k_2$) e una perdita del 95 % nella fase di depurazione ($3.0/k_2$), la fase di depurazione sarà pari a circa il doppio della durata della fase di assorbimento.

Occorre osservare che le stime si basano sull'ipotesi secondo cui il processo di assorbimento e di depurazione segue una cinetica di primo ordine. Se tali procedimenti non rispondono manifestamente a una cinetica di primo ordine, tali stime non sono valide.

4. METODO SEQUENZIALE: DETERMINAZIONE DELLA COSTANTE CINETICA DI DEPURAZIONE (PERDITA) K_2

Si è ipotizzato che la maggior parte dei dati riguardanti la bioconcentrazione fossero «ragionevolmente» ben descritti mediante un semplice modello a due compartimenti e due parametri, come indicato dalla curva rettilinea che approssima i punti che rappresentano la concentrazione nel pesce (su un grafico logaritmico), durante la fase di depurazione.



Si noti che le deviazioni dalla linea retta possono indicare uno schema di depurazione più complesso di una cinetica di primo ordine. Il metodo grafico può essere applicato per risolvere i tipi di depurazione che si discostano dalla cinetica di primo ordine.

Per calcolare k_2 per multipli punti (di campionamento) nel tempo, effettuare una regressione lineare del logaritmo naturale della concentrazione in funzione del tempo. Il coefficiente angolare della linea di regressione è una stima di k_2, la costante cinetica di depurazione ([1]) Dall'ordinata, la concentrazione media nel pesce all'inizio della fase di depurazione (C0, D; che è pari alla media delle concentrazioni nel pesce alla fine della fase di assorbimento), può essere facilmente calcolata (compresi i margini di errore) ([1]):

([1]) Nella maggior parte dei programmi che consentono una regressione lineare, sono forniti anche gli errori standard e l'intervallo di confidenza (IC) delle stime, ad esempio in Microsoft Excel utilizzando i dati dello strumento di analisi Pack.

▼M7

$$C_{0,\ d} = e^{intercept} \qquad \text{[equazione A5.21]}$$

Per calcolare k_2 quando sono disponibili solo due punti di (campionamento) nel tempo (come nella prova ridotta), sostituire le due concentrazioni medie nell'equazione:

$$k_2 = \frac{\ln\ (C_{fl})\ -\ \ln\ (C_{f2})}{t_{\ 2}\ -\ t_1} \qquad \text{[equazione A5.22]}$$

Dove ln (C_{f1}) e ln (C_{f2}) sono i logaritmi naturali delle concentrazioni rispettivamente ai tempi t_1 e t_2 e t_2 e t_1 sono i momenti in cui i due campioni sono stati raccolti in relazione all'inizio della depurazione ([1]).

5. METODO SEQUENZIALE: DETERMINAZIONE DELLA COSTANTE CINETICA DI ASSORBIMENTO K_1 (SOLO NEL METODO DI ESPOSIZIONE IN AMBIENTE ACQUATICO)

Per trovare un valore di k_1 data una serie di valori sequenziali della concentrazione in funzione del tempo per la fase di assorbimento, occorre utilizzare un programma informatico che corrisponda al seguente modello:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{\ -k_2 t}) \qquad \text{[equazione A5.23]}$$

Quando k_2 è dato dal precedente calcolo, C_f (t) e C_w (t) sono le concentrazioni nel pesce e nell'acqua, rispettivamente, al tempo t.

Per calcolare k_1 quando sono disponibili solo due punti di (campionamento) nel tempo (come nella prova ridotta), si utilizza la formula seguente:

$$k_1 = \frac{C_{\ f}\ \cdot k_2}{C_w(1\ -\ e^{-k_2 t})} \qquad \text{[equazione A5.24]}$$

Quando k_2 è dato dal precedente calcolo, C_f è la concentrazione nel pesce all'inizio della fase di depurazione e C_w è la concentrazione media in acqua durante la fase di assorbimento ([2]).

Per valutare la bontà di adattamento, si può procedere ad un'ispezione visiva delle pendenze k_1 e k_2 rispetto ai valori misurati ai tempi di campionamento riportati nel grafico. Se risulta che il metodo sequenziale ha fornito una scarsa stima di k_1, è opportuno applicare il metodo simultaneo per calcolare k_1 e k_2 (cfr. sezione 6 in appresso). Ancora in questo caso, per valutare la bontà di adattamento, è necessario paragonare visivamente le pendenze ottenute con i valori misurati contenuti nel grafico. Se l'adattamento non è ancora soddisfacente, ciò può significare che la cinetica di primo ordine non si applica e che occorre impiegare modelli più complessi.

6. METODO DI CALCOLO SIMULTANEO DELLE COSTANTI CINETICHE DI ASSORBIMENTO E DEPURAZIONE (PERDITA) (SOLO METODO DI ESPOSIZIONE IN AMBIENTE ACQUATICO)

È possibile utilizzare i programmi informatici per calcolare i valori di k_1 e k_2 data una serie di valori sequenziali della concentrazione in funzione del tempo e il modello:

$$C_f = C_{\ w} \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{\ -k_2 t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[equazione A5.25]}$$

$$C_f = C_{\ w} \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{\ -k_2(t\ -\ t_c)}\ -\ e^{\ -k_2 t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[equazione A5.26]}$$

dove

t_c = tempo al termine della fase di assorbimento.

Tale approccio fornisce direttamente errori standard per le stime di k_1 e k_2. Se k_1/k_2 è sostituita dal BCF (cfr. equazione A5.4) nelle equazioni A5.25 e A5.26, è possibile stimare l'errore standard e l'intervallo di confidenza del 95 % del fattore di bioconcentrazione (BCF). Ciò è particolarmente utile per

([1]) Contrariamente al metodo di regressione lineare, questa formula non darà generalmente un errore standard di k2.

([2]) In contrasto con una procedura di approssimazione, questo metodo lineare di solito non generare un errore standard o intervallo di confidenza per la stima di k1.

▼M7

comparare le stime diverse derivanti dalla trasformazione dei dati. La variabile dipendente (concentrazione nel pesce) può essere adattata con o senza trasformazione in logaritmo naturale, e si può valutare l'incertezza circa il BCF ottenuto.

A causa della forte correlazione tra i due parametri, k_1 e k_2, se sono stati stimati simultaneamente, si consiglia di calcolare anzitutto k_2 dai risultati della depurazione (cfr. sopra). Nella maggior parte dei casi, k_2 può essere stimato a partire dalla curva di depurazione con una precisione relativamente elevata. Successivamente, k_1 può essere calcolato a partire dai dati di assorbimento con una regressione non lineare ([1]). Si raccomanda di trasformare i dati nello stesso modo in caso di adattamento sequenziale.

Per valutare la bontà di adattamento, si può procedere ad un'ispezione visiva delle pendenze ottenute riportando su un grafico i dati misurati al tempo di campionamento. Se risulta che tale metodo fornisce una stima scarsa di k_1, occorre applicare il metodo alternativo per calcolare k_1 e k_2. Anche in questo caso, per valutare la bontà di adattamento, si dovrebbe comparare visivamente il modello adeguato ai dati misurati contenuti nel grafico, e le stime dei parametri per k_1, k_2 e il BCF ottenuto nonché i loro errori standard e/o gli intervalli di fiducia devono essere confrontati tra diversi tipi di adattamento.

Se la bontà di adattamento non è ancora soddisfacente, ciò può significare che la cinetica di primo ordine non si applica e che occorre impiegare modelli più complessi. Una delle complicazioni più comuni è la crescita del pesce durante la prova.

7. CORREZIONE DELL'EFFETTO DI DILUIZIONE DOVUTO ALLA CRESCITA PER IL BCF CINETICO E IL BMF

La presente sezione descrive un metodo standard per la correzione dovuta alla crescita dei pesci durante la prova (il cosiddetto «effetto di diluizione dovuto alla crescita») che vale solo quando si applica una cinetica di primo ordine. Se non si applica la cinetica di primo ordine, si consiglia di rivolgersi ad un esperto di biostatistica per correggere i dati dell'effetto di diluizione dovuto alla crescita o di utilizzare l'approccio basato sulla massa descritti di seguito.

In alcuni casi, tale metodo di correzione dell'effetto di diluizione della crescita manca di precisione o non funziona (ad esempio, per sostanze testate che si eliminano molto lentamente nei pesci in rapida crescita, la costante cinetica di depurazione corretta per la crescita, k_2g, può essere molto modesta, e quindi l'errore nelle due costanti cinetiche usate per calcolarlo è cruciale, e in alcuni casi il valore kg stimato può essere superiore a k_2). È possibile utilizzare un altro metodo (approccio di massa), che evita di apportare eventuali correzioni e opera anche in assenza di una cinetica di primo ordine. Questo metodo è presentato alla fine della presente sezione.

Metodo di correzione della crescita mediante sottrazione della costante cinetica di crescita

In base alla metodologia standard, i pesi e le lunghezze individuali sono convertiti in logaritmi naturali e ln (peso) o ln (1/ peso) sono riportati graficamente in funzione del tempo (giorno) in due grafici distinti per i gruppi di controlli e il gruppo di prova. Si procede analogamente con i dati ottenuti separatamente per le fasi di assorbimento e di depurazione. In generale, per correggere gli effetti di diluizione dovuto alla crescita, è più opportuno fare riferimento al peso dell'insieme dello studio per ottenere la costante cinetica di

([1]) Occorre tener conto del fatto che l'incertezza nella stima di k2 non è utilizzata adeguatamente nel modello di bioaccumulo quando è essenzialmente considerata come costante continua quando si adatta k1 con il metodo sequenziale. L'incertezza circa il BCF ottenuto sarà, perciò, differente a seconda che si applica il metodo di adattamento simultaneo o sequenziale.

▼M7

crescita (kg), ma differenze statisticamente significative tra le costanti cinetiche di crescita sia per la fase di assorbimento sia per la fase di depurazione possono far ritenere opportuno usare la costante cinetica della fase di depurazione. I tassi di crescita globali osservati in studi con esposizione in ambiente acquatico per i gruppi di controllo e di prova possono essere utilizzati per accertare eventuali effetti correlati al trattamento.

Una correlazione dei minimi quadrati lineari è calcolata per ln (peso del pesce) in funzione del tempo (giorno) (ln (1/ peso) in funzione del tempo per ciascun gruppo (gruppi di prova e di controllo, dati individuali, medie non giornaliere) per l'intero studio, le fasi di assorbimento e di depurazione applicando i metodi statistici standard. Le variazioni delle pendenze delle linee sono calcolate e utilizzate per valutare la significatività statistica (p = 0,05) della differenza tra le pendenze (costanti cinetiche di crescita) utilizzando il test t (o di ANOVA se sono testate più di una concentrazione). Si preferisce generalmente utilizzare i dati sul peso per le correzioni per la crescita. Le lunghezze, trattate allo stesso modo, possono essere usate per valutare gli effetti del trattamento su gruppi di controllo e di prova. Se non si rileva alcuna differenza statisticamente significativa nell'analisi dei dati sul peso, si possono raggruppare i dati dei gruppi di controllo e di prova e calcolare la costante cinetica di crescita del pesce globale per lo studio (kg) vale a dire la pendenza globale della correlazione lineare. Se si osservano differenze statisticamente significative, si registrano separatamente le costanti cinetiche di crescita per ciascun gruppo di pesci e/o ciascuna fase della prova. La costante cinetica per ciascun gruppo trattato viene utilizzata per le correzioni dell'effetto di diluizione dovuto alla crescita in questo gruppo. Se vi sono differenze statistiche tra le costanti cinetiche di assorbimento e di depurazione, si usano le costanti cinetiche ricavate dalla fase di depurazione.

La costante cinetica di crescita calcolata (kg espresso in giorni^{-1}) può essere dedotta dalla costante cinetica di depurazione complessiva (k_2) per garantire la costante cinetica di depurazione, k_2g..

$$k_{2\ g} = k_2 - k_g \qquad \text{[equazione A5.27]}$$

Suddividendo la costante cinetica di assorbimento per la costante cinetica di depurazione corretta per la crescita per ottenere il fattore di bioconcentrazione cinetico corretto per l'effetto di diluizione dovuto alla crescita, denominato $BCF_{K\ g}$ (o BMF_{Kg}).

$$BCF_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \qquad \text{[equazione A5.28]}$$

La costante cinetica di crescita ottenuta per una prova con esposizione per via alimentare è utilizzata nell'equazione A7.5 per calcolare il BMF_{Kg} corretto per la crescita (cfr. appendice 7).

Metodo di correzione della crescita basata sulla massa

Un'alternativa al suddetto «Metodo di correzione della crescita mediante sottrazione della costante cinetica di crescita», che consente di evitare la necessità di correggere per la crescita, può essere utilizzata nel modo seguente. Si tratta fondamentalmente di utilizzare dati sulla depurazione in funzione della massa per pesce intero piuttosto che in funzione della concentrazione.

Convertire le concentrazioni riscontrate nei tessuti in fase di depurazione (massa della sostanza in esame/unità di massa del pesce) in massa della sostanza in esame/pesce: mettere in corrispondenza, sotto forma di tabella, le concentrazioni e il peso di ciascun pesce (ad esempio utilizzando un foglio di calcolo elettronico) e moltiplicando ciascuna concentrazione per il totale del peso del pesce in modo che la misura fornisca una serie di massa della sostanza in esame/pesce in tutte le sessioni di campionamento della fase di depurazione.

Tracciare il logaritmo naturale ottenuto con i dati della massa della sostanza chimica in funzione del tempo (fase di depurazione) come si farebbe normalmente.

▼M7

Per il metodo di esposizione in ambiente acquatico, calcolare la costante cinetica di assorbimento come di consueto (cfr. sezioni 4 e 6; il valore k_2 «normale» è utilizzato nelle equazioni di interpolazione della curva di k_1) e detrarre la costante cinetica di depurazione da tali dati. Poiché il valore ottenuto per la costante cinetica di depurazione è indipendente dalla crescita, in quanto è stato ottenuto in base alla massa per pesce intero, va indicato come k_2g e non k_2.

8. NORMALIZZAZIONE DEI LIPIDI AL 5 % DEL TENORE DI GRASSI (SOLO METODO DI ESPOSIZIONE IN AMBIENTE ACQUATICO)

I risultati del BCF (cinetico e allo stato stazionario) delle prove con esposizione in ambiente acquatico sono registrati anche in funzione del contenuto lipidico standard del 5 % del peso umido dei pesci, tranne quando si può provare che la sostanza in esame non si accumula nei grassi (ad esempio alcune sostanze perfluorurate possono legarsi alle proteine). Occorre convertire le concentrazioni nei pesci, o il BCF, in un tenore di lipidi del 5 % rispetto al peso umido. Se i pesci sono stati utilizzati per misurare le concentrazioni della sostanza e il contenuto lipidico in tutti i tempi di campionamento, è opportuno correggere le concentrazioni misurate individualmente in funzione del contenuto lipidico dei pesci.

$$C_{f,L} = \frac{0{,}05}{L} \cdot C_f \qquad \text{[equazione A5.29]}$$

Dove

$C_{f,L}$ = concentrazione normalizzata in relazione ai lipidi nel pesce (mg kg-1 di peso umido)

L = frazione di lipidi (sulla base del peso umido)

Cf = concentrazione della sostanza in esame nel pesce (mg kg-1 di peso umido)

Se non è stata eseguita un'analisi dei lipidi in tutti i pesci campionati, si utilizza un valore medio dei lipidi per normalizzare il BCF. Per quanto riguarda il fattore di bioconcentrazione (BCF) allo stato stazionario, occorre utilizzare il valore medio registrato alla fine della fase di assorbimento nel gruppo trattato. Per quanto concerne la normalizzazione del BCF cinetico vi possono essere casi in cui è giustificato un approccio diverso, ad esempio se il tenore di lipidi cambia notevolmente durante la fase di assorbimento e di depurazione. Tuttavia, si consiglia di prevedere un regime alimentare che consenta di ridurre al minimo qualunque cambiamento significativo del tenore di grassi.

$$BCF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot BCF_K \qquad \text{[equazione A5.30]}$$

Dove

$BCF_{K\ L}$ = BCF cinetico normalizzato per il tenore lipidico (L kg-1)

L_n = *frazione di lipidi media (sulla base del peso umido)*

BCF_K = fattore di bioconcentrazione cinetico (L kg-1)

BIBLIOGRAFIA

(1) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343–2355.

(2) Capitolo C.20 del presente allegato, Prova di riproduzione con *Daphnia magna*.

(3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1: 309-320.

▼**M7**

(4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined in vivo and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

(6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.

(7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

(8) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

(9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. T. Am. Fish. Soc. 104: 785-792.

(10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals, Sheeman, P., *et al*., Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.

(11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. Can. J. Chem. Eng. 55: 614-622.

(12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. Chemosphere. 9: 3-19.

▼M7

Appendice 6

EQUAZIONI PER LA PROVA DI ESPOSIZIONE IN AMBIENTE ACQUATICO: DISEGNO SPERIMENTALE DELLE PROVE RIDOTTE

I motivi che giustificano siffatta impostazione consistono nel fatto che il fattore di bioconcentrazione in una prova completa può essere determinato come fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario (BCF_{SS}) calcolando il rapporto tra la concentrazione della sostanza in esame nei tessuti del pesce e la concentrazione della sostanza in esame nell'acqua, o calcolando il fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_k), come il rapporto tra la costante cinetica di assorbimento k_1 alla costante cinetica di depurazione k_2. Il BCF_k è valido anche se una concentrazione allo stato stazionario di una sostanza chimica non è raggiunta durante l'assorbimento, a condizione che l'assorbimento e la depurazione agiscano approssimativamente secondo processi cinetici di primo ordine.

Se si misura la concentrazione della sostanza nei tessuti (C_{f1}) alla fine dell'esposizione (t_1) e si misura la concentrazione nei tessuti (C_{f2}) nuovamente dopo un certo tempo (t_2), si può stimare la costante cinetica di depurazione (k_2) con l'equazione A5.22 dell'appendice 5.

La costante cinetica di assorbimento, k_1, può essere determinata in modo algebrico con l'equazione A5.23 dell'appendice 5 (dove C_f è pari a C_{f1} e t è pari a t_1) (1). Il fattore di bioconcentrazione cinetico per il disegno sperimentale della prova ridotta (designato come $BCF_{K\ m}$ per distinguerlo dai fattori di bioconcentrazione cinetica determinati con altri metodi) è:

$$BCF_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[equazione A6.1]}$$

È opportuno correggere le concentrazioni o i risultati dell'effetto di diluizione dovuto alla crescita e normalizzare rispetto a un contenuto di grassi nel pesce del 5 % (cfr. appendice 5).

Il BCF_{SS} minimizzato corrisponde al BCF calcolato alla fine della fase di assorbimento, supponendo che sia raggiunto lo stato stazionario. Ciò può essere solo presunto, in quanto il numero dei punti di campionamento non è sufficiente per dimostrarlo.

$$\text{minimisedBCF}_{SS} = \frac{C_{f\ -minSS}}{C_{w\ -minSS}} \qquad \text{[equazione A6.2]}$$

Dove

$C_{f\text{-}minSS}$ = concentrazione nel pesce allo stato stazionario assunto alla fine dell'assorbimento (mg kg^{-1} di peso umido).

$C_{w\text{-}minSS}$ = *concentrazione in acqua allo stato stazionario presunto alla fine dell'assorbimento (mg* kg^{-1}*).*

BIBLIOGRAFIA

(1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

▼M7

Appendice 7

EQUAZIONE PER LA PROVA CON ESPOSIZIONE PER VIA ALIMENTARE

1. Esempio di quantità di componenti di un adeguato mangime commerciale per pesci

2. Esempi di tecniche di addizionamento dell'alimento

3. Calcolo dell'efficienza di assimilazione e del fattore di biomagnificazione

4. Correzione dei lipidi

5. Valutazione delle differenze tra tempo misurato concentrazione zero ($C_{0,\ m}$) e derivati (tempo zero la concentrazione $C_{0,\ D}$)

6. Orientamenti per testare sostanze che si eliminano molto rapidamente

1. ESEMPIO DI QUANTITÀ DI COMPONENTI DI UN ADEGUATO MANGIME COMMERCIALE PER PESCI

Componenti principali	Mangime per pesci
Proteina grezza	≤ 55,0 %
Sostanze grasse grezze	≤ 15,0 % ([1])
Fibra grezza	≥ 2,0 %
Umidità	≥ 12 %
Ceneri	≥ 8 %

([1]) In alcune regioni, potrebbe essere possibile ottenere solo mangimi per pesco con un tenore lipidico molto inferiore a tale massimale. In tal caso, occorre effettuare la prova con il tenore di grassi inferiore nei mangimi e adeguare la razione alimentare in modo da mantenere i pesci in buona salute. È preferibile non aumentare artificialmente il tenore lipidico dei mangimi aggiungendo troppo di olio.

2. ESEMPI DI TECNICHE DI ADDIZIONAMENTO DELL'ALIMENTO

Aspetti generali

L'alimentazione per il gruppo di controllo è preparata esattamente allo stesso modo dei mangimi addizionati, ma senza l'aggiunta della sostanza in esame.

Per conoscere le concentrazioni nei mangimi trattati, occorre estrarre tre campioni di alimenti trattati con un idoneo un metodo di estrazione e misurare la radioattività e la concentrazione della sostanza in esame negli estratti. La possibilità di isolare la sostanza in esame (> 85 %) e la modesta variazione tra i campioni (tre concentrazioni della sostanza misurata su campioni prelevati all'inizio della prova non devono variare di oltre ± 15 % rispetto al valore medio) devono essere dimostrate.

Durante la prova con esposizione per via alimentare, è opportuno raccogliere tre campioni di alimenti al giorno 0 e alla fine della fase di assorbimento per determinare la concentrazione della sostanza in esame negli alimenti.

Preparazione di mangimi per pesci con un materiale sperimentale liquido (puro)

Stabilire una concentrazione nominale di prova nel regime alimentare dei pesci, ad esempio 500 µg di sostanza in esame/g di mangimi. La quantità appropriata (in funzione della massa molare o radioattività specifica) della sostanza in esame pura è addizionata ad una massa nota di un mangime per pesci in un barattolo di vetro o un evaporatore rotante. La massa di cibo deve essere sufficiente per tutta la durata della fase di assorbimento (tenere conto della necessità di aumentare le razioni a motivo della crescita

▼M7

dei pesci). I mangimi per pesci e la sostanza in esame vanno mescolati lentamente nel corso della notte (ad esempio mediante un miscelatore «roto-rack» o, in caso di utilizzo di un evaporatore rotante, a rotazione). La dieta addizionata è conservata in condizioni che mantengano la stabilità della sostanza in esame all'interno della miscela (mediante refrigerazione) fino all'utilizzo.

Preparazione di mangimi per pesci con un disperdente (olio di pesce/ mais)

Le sostanze solide devono essere triturate in polvere fine in un mortaio. Le sostanze liquide possono essere aggiunte direttamente all'olio di mais o di pesce. La sostanza sotto esame viene disciolta in una quantità nota di olio di mais o di pesce (per esempio da 5-15 ml). L'olio è trasferito quantitativamente trasferito mediante un evaporatore di tipo rotativo di dimensioni adatte. Il recipiente utilizzato per preparare i dosaggi di olio dovrebbe essere sciacquato con due piccole aliquote di olio e queste aggiunte all'evaporatore per assicurare che sia trasferita tutta la sostanza in esame disciolta. Per garantire la completa dissoluzione o dispersione nell'olio (o se più di una sostanza in esame viene utilizzata nello studio), è aggiunto un micro-miscelatore, il recipiente tappato e la miscela agitata rapidamente durante la notte. Una quantità adeguata di mangimi per pesci (solitamente sotto forma di pellet) per la prova è aggiunta all'evaporatore e i contenuti dello stesso vengono mescolati in modo omogeneo facendo ruotare continuamente l'evaporatore di vetro per almeno 30 minuti, ma preferibilmente durante la notte. In seguito, il mangime addizionato è conservato in modo appropriato (ad.es. refrigerato) per garantire la stabilità della sostanza in esame nel mangime fino all'utilizzo.

Preparazione di mangimi per pesci con un solvente organico

Una quantità adeguata della sostanza in esame (per massa molare o radioattività specifica) sufficiente per raggiungere l'obiettivo di dose è disciolta in un solvente organico idoneo (ad esempio, cicloesano o acetone; 10-40 ml, ma un maggiore volume se necessario in funzione della quantità di mangime da addizionare). Miscelare un'aliquota di questa soluzione o la sua totalità (riferita alla porzione addizionata) con un'adeguata massa di mangime per pesci, sufficiente perché la prova ottenga il necessario livello di dose nominale. Il mangime/sostanza in esame può essere miscelato in vasca in acciaio inossidabile e il mangime addizionato recentemente deve rimanere nella vasca in una cappa di laboratorio agitata per due giorni (occasionalmente) per consentire l'eccesso di solvente supplementare, oppure essere mescolato in un evaporatore rotante a bulbo con rotazione continua. L'eccesso di solvente può essere rimosso mediante un getto di aria o azoto, se necessario. Fare attenzione a che la sostanza in esame non cristallizzi man mano che il solvente viene rimosso. La dieta addizionata deve essere conservata in condizioni di refrigerazione (ad esempio) che mantengono la stabilità della sostanza in esame nel mix di mangime fino all'utilizzo.

3. CALCOLO DELL'EFFICIENZA DI ASSIMILAZIONE E DEL FATTORE DI BIOMAGNIFICAZIONE

Per calcolare l'efficienza di assimilazione occorre innanzitutto stimare la costante cinetica di depurazione globale come indicato nella sezione 4 dell'appendice 5 (con il metodo sequenziale, cioè con una regressione lineare standard) con concentrazioni medie misurate nei campioni della fase di depurazione. La costante della razione alimentare, *I*, e la durata di assorbimento, *t*, sono parametri noti dello studio. C_{food}, la concentrazione media misurata della sostanza in esame negli alimenti, è una variabile misurata nel corso dello studio. $C_{0,d}$ la concentrazione della sostanza in esame nel pesce alla fine della fase di assorbimento, è comunemente calcolata dall'intercetta della rappresentazione grafica del logaritmo naturale della concentrazione in funzione del giorno di depurazione.

L'efficienza di assimilazione della sostanza in esame (a, assorbimento della sostanza in esame nell'intestino) è calcolata come segue:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{food}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \qquad \text{[equazione A7.1]}$$

Dove

C0, D= concentrazione nel pesce ottenuta al giorno 0 della fase di depurazione (mg kg-1);

▼M7

k_2 = costante cinetica di depurazione (non corretta per la crescita) globale (giorno-1), calcolato in base alle equazioni di cui all'appendice 5, sezione 3;

I = costante cinetica di ingestione (g di cibo $g^{-1\ \text{di pesce}}$ giorno^{-1});

Cfood= concentrazione nel cibo (mg kg-1 di cibo);

t = durata del periodo di somministrazione (giorno)

Tuttavia può rendersi necessario adeguare alla crescita dei pesci la razione alimentare, *I*, utilizzato nei calcoli per ottenere un'efficienza di assimilazione (a) più precisa. In una prova in cui i pesci crescono in misura significativa durante la fase di assorbimento (durante la quale non si corregge la quantità di cibo per mantenere il tasso di somministrazione stabilito), il tasso effettivo di somministrazione alimentare man mano che la fase di assorbimento progredisce diventerà inferiore a quello stabilito, con un conseguente valore della «effettiva» efficienza di assimilazione superiore. (Questo aspetto non è rilevante per i calcoli complessivi del BMF, poiché i termini I si annullano tra le equazioni A7.1 e A7.4). Il tasso medio di somministrazione corretto dell'effetto di diluizione dovuto alla crescita, I_g, può essere ottenuto in vari modi, ma un metodo semplice e rigoroso consiste nell'utilizzare la costante cinetica di crescita (k_g) nota per stimare il peso dei pesci testati in determinati periodi della fase di assorbimento:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \qquad \text{[equazione A7.2]}$$

Dove

$W_f(t)$ = peso medio dei pesci al giorno t della fase di assorbimento

Wf,0= media del peso dei pesci all'inizio dell'esperimento

In questo modo (almeno), si può stimare il peso medio dei pesci nell'ultimo giorno di esposizione ($W_{f,\text{end-of-uptake}}$). Poiché il tasso di somministrazione alimentare è stato stabilito in base a $W_{f,0}$, l'effettivo tasso per ogni giorno di assorbimento può essere calcolato utilizzando i valori relativi al peso. Il tasso di somministrazione alimentare corretto per la crescita, Ig (g di cibo g-1 di pesce giorno-1), da utilizzare in sostituzione di *I* in caso di rapida crescita durante la fase di assorbimento, può essere calcolata come

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,\,end-of-uptake}} \qquad \text{[equazione A7.3]}$$

Una volta ottenuta l'efficienza di assimilazione, si può calcolare il BMF moltiplicandolo per la costante del tasso di alimentazione *I* (o Ig, se quest'ultimo è stato utilizzato per calcolare α) e dividendo il prodotto per la costante cinetica di depurazione globale k_2:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_2} \qquad \text{[equazione A7.4]}$$

Il fattore di biomagnificazione corretto per la crescita è calcolato secondo le stesse modalità, impiegando la costante cinetica di depurazione corretta per la crescita (ottenuta come indicato nella sezione 7 dell'appendice 5). Ancora una volta, se Ig è servito a calcolare α, è opportuno utilizzarlo anche qui invece di I:

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \qquad \text{[equazione A7.5]}$$

dove:

α = efficienza di assimilazione (assorbimento della sostanza in esame per via intestinale).

k_2 = costante cinetica di depurazione (non corretta per la crescita) globale (giorno-1), calcolata con le equazioni di cui all'appendice 5, sezione 3;

▼M7

k_2g = costante cinetica di depurazione corretta per la crescita (giorno-1);

I = costante cinetica di ingestione (g di cibo g-1 di pesce giorno-1);

Il tempo di dimezzamento corretto per la crescita ($t_{1/2}$) è calcolato come segue:

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{k_{2g}} \qquad \text{[equazione A7.6]}$$

È possibile stimare anche l'efficienza di assimilazione della sostanza chimica con il cibo se sono determinati residui nei tessuti durante la fase lineare della fase di assorbimento (tra i giorni 1 e 3). In questo caso occorre analizzare l'efficienza di assimilazione della sostanza (α) come segue:

$$\alpha = \frac{C_{fish}(t)}{I \times C_{food} \times t} \qquad \text{[equazione A7.7]}$$

Dove

C_{fish} *(t)* = concentrazione della sostanza in esame nel pesce di prova al tempo t (mg kg-1 di peso umido).

4. CORREZIONE DEL TENORE DI GRASSI

Se il tenore di lipidi è stato misurato negli stessi pesci sottoposti all'analisi chimica in tutti i tempi di campionamento, si consiglia di correggere le concentrazioni individuali in funzione dei lipidi e di tracciare il logaritmo naturale della concentrazione, corretto per il tenore di grassi in funzione della depurazione (giorno) per ottenere $C_{0,\text{d}}$ e k_2. L'efficienza di assimilazione (equazione A7.1) può esser calcolata sulla base dei lipidi utilizzando C_{food} sulla base dei lipidi (cioè C_{food} è moltiplicato per la frazione media di grassi negli alimenti). Calcoli successivi con le equazioni A7.4 e A7.5 daranno il BMF corretto per il tenore lipidico (e dell'effetto di diluizione dovuto alla crescita) direttamente.

In caso contrario, le frazioni medie di grassi (peso umido) nel pesce e nei mangimi sono ottenute per entrambi i gruppi, di controllo e di prova (per quanto riguarda il cibo e i pesci del gruppo di controllo, ciò si ottiene generalmente dai dati misurati all'inizio e alla fine dell'esposizione; per il gruppo di trattamento, si ottiene generalmente dai dati misurati solo alla fine dell'esposizione). In alcuni studi, il contenuto lipidico dei pesci può aumentare sensibilmente; in tal caso è preferibile utilizzare una concentrazione media dei lipidi nel pesce testato calcolata sulla base dei valori misurati alla fine dell'esposizione e alla fine della depurazione. In generale, i dati dal solo gruppo di prova dovrebbero essere utilizzati per ottenere entrambe le frazioni di grassi.

Il fattore di correzione del tenore di grassi (Lc) è calcolato come segue:

$$L_C = \frac{L_{fish}}{L_{food}} \qquad \text{[equazione A7.8]}$$

In cui L_{fish} and L_{food} sono le frazioni medie di grassi rispettivamente nel pesce e nei mangimi.

I Il fattore di correzione del tenore di grassi è usato per il calcolo del fattore di biomagnificazione corretto per il tenore lipidico (BMFL):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_C} \qquad \text{[equazione A7.9]}$$

5. VALUTAZIONE DELLE DIFFERENZE TRA LA CONCENTRAZIONE MISURATA AL TEMPO 0 ($C_{0,\text{M}}$) E LA CONCENTRAZIONE CALCOLATA PER IL TEMPO 0 ($C_{0,\text{D}}$)

Occorre confrontare la concentrazione misurata al tempo 0 ($C_{0,\text{m}}$) e la concentrazione calcolata per il tempo 0 ($C_{0,\text{d}}$). Se sono molto simili, si può ritenere adeguato il modello di primo ordine utilizzato per ottenere i parametri di depurazione.

▼M7

In alcuni studi, si osserverà una differenza sostanziale tra il valore ottenuto per il tempo 0, $C_{0,d}$, e la concentrazione media misurata al tempo 0, $C_{0,m}$ (cfr. ultimo trattino del paragrafo 159). Se C0, D è nettamente inferiore a C_0, $C_{0,m}$ ($C_{0,d} << C_{0,m}$), tale differenza può indicare la presenza, nell'intestino dei pesci, di mangimi addizionati non digeriti. Per averne la prova, si possono analizzare separatamente gli intestini escissi se, alla fine della fase di assorbimento, sono stati prelevati e conservati esemplari supplementari di pesce. In caso contrario, qualora risulti da un test di outlier statisticamente valido applicato alla regressione lineare della fase di depurazione che il primo punto di campionamento della fase di depurazione è erroneamente elevato, può essere utile proseguire la regressione lineare per ottenere k_2, ma omettendo la concentrazione al primo tempo della depurazione. In tal caso, se l'incertezza nella regressione lineare appare fortemente diminuita e appare evidente che il processo di depurazione abbia seguito approssimativamente una cinetica di primo ordine, si possono utilizzare i valori $C_{0,d}$ e k_2 ottenuti con il calcolo dell'efficienza di assimilazione. Ciò deve essere debitamente giustificato nella relazione di prova. È inoltre possibile che la fase di depurazione non abbia seguito una cinetica di primo ordine. Se tale ipotesi è probabile (cioè i dati trasformati con logaritmo naturale sembrano seguire una curva rispetto alla retta di regressione lineare), è poco probabile che i calcoli di k_2 e $C_{0,d}$ siano validi, e si raccomanda di ricorrere al consiglio di un esperto in biostatistica.

Se $C_{0,d}$ è nettamente superiore al valore misurato ($C_{0,d} > > C_{0,dm}$) ciò potrebbe significare: che la sostanza è stata eliminata in tempi rapidi (il tempo di campionamento si avvicina al limite di quantificazione del metodo analitico molto all'inizio della fase di depurazione, cfr. la sezione 6); che il processo di depurazione non segue una cinetica di primo ordine; che la regressione lineare per ottenere k_2 e $C_{0,d}$ è errata; o che si è verificato un problema con le concentrazioni misurate nel corso dello studio in alcuni punti di campionamento. È quindi necessario esaminare il tracciato della regressione lineare per identificare i campioni al limite o in prossimità del limite di quantificazione, i valori anomali e una curva manifesta (che suggerirebbe che la depurazione non ha seguito una cinetica di primo ordine) e evidenziarne chiaramente i risultati nella relazione di prova. Ogni successiva rivalutazione della regressione lineare per migliorare le stime dovrà essere descritta e giustificata. Se si registra una deviazione significativa della cinetica di primo ordine, è poco probabile che i calcoli di k_2 e $C_{0,d}$ siano validi, e si raccomanda di ricorrere al consiglio di un esperto in biostatistica.

6. ORIENTAMENTI PER TESTARE SOSTANZE CHE SONO ELIMINATE MOLTO RAPIDAMENTE

Come indicato al paragrafo 129, alcune sostanze possono avere un'eliminazione talmente rapida da non poter ricavare una concentrazione affidabile al tempo 0, $C_{0,d}$ né k_2 perché la sostanza non è più effettivamente misurata (concentrazioni sono al limite della quantificazione) già molto presto nel corso della fase di depurazione (a partire dal secondo campionamento). Tale situazione, rilevata in occasione della prova inter-laboratori eseguita con il benzo [a] pirene, è stata riportata nella relazione di validazione del presente metodo di prova. In questo caso non è possibile proseguire la regressione lineare in modo attendibile, in quanto risulterebbe probabilmente una stima eccessivamente elevata di $C_{0,d}$, con un'efficienza di assimilazione che apparirebbe nettamente superiore a 1. In tal caso, si può procedere a una stima prudente di k_2 e si può calcolare un «limite superiore» di BMF.

Utilizzando i dati dei tempi della fase di depurazione in cui è stata misurata la concentrazione, fino alla prima concentrazione non rilevata (ivi compresa) (concentrazione al limite della quantificazione) una regressione lineare (basata sulle concentrazioni trasformate in logaritmi naturali in funzione del tempo) fornirà una stima di k_2. Ciò richiederà spesso solo due tempi di misurazione (ad esempio i giorni di campionamento 1 e 2 della fase di depurazione) e k_2 potrà poi essere stimato con l'equazione A5.22 presentata nell'appendice 5. Tale stima di k_2 può servire a calcolare l'efficienza di

▼M7

assimilazione con l'equazione A7.1, sostituendo al valore $C_{0,d}$ nella formula la concentrazione misurata al tempo 0 ($C_{0,m}$) qualora la stima di $C_{0,d}$ sia nettamente superiore a quanto il test avrebbe consentito di ottenere. Se $C_{0,m}$ non era misurabile, utilizzare il limite di rilevamento analitico nei tessuti dei pesci. Se, in alcuni casi, ciò dà un valore $\alpha > 1$ allora si presume che l'efficienza di assimilazione pari a 1 rappresenti il «caso peggiore».

Il valore massimo di BMF_K può essere stimato con l'equazione A7.4 e dovrà essere indicato come un valore «molto inferiore a» (<<). Ad esempio, uno studio condotto con un tasso di alimentazione del 3 % e un tempo di dimezzamento di depurazione inferiore a 3 giorni, e il «caso peggiore» di $\alpha = 1$, il BMF_K rischia di essere inferiore a circa 0,13. Dato lo scopo di questa stima e il fatto che i valori avranno carattere prudenziale, non è necessario correggerli degli effetti di diluizione dovuto alla crescita e per il contenuto di lipidi nel pesce o nel cibo.

▼M7

Appendice 8

METODI PER STIMARE I BCF PROVVISORI SULLA BASE DEI DATI RACCOLTI NELLO STUDIO CON ESPOSIZIONE PER VIA ALIMENTARE

Il metodo di esposizione per via alimentare è presentato nel presente metodo di prova per testare il bioaccumulo delle sostanze che non possono essere testate con il metodo di esposizione attraverso l'ambiente acquatico. Il metodo di esposizione attraverso l'ambiente acquatico dà un fattore di bioconcentrazione, mentre quello per via alimentare fornisce direttamente informazioni sul potenziale di biomagnificazione degli alimenti. In diversi regimi di sicurezza dei prodotti chimici sono necessarie informazioni sulla bioconcentrazione acquatica (ad esempio per la valutazione dei rischi o il sistema mondiale armonizzato di classificazione). È pertanto necessario utilizzare i dati ottenuti da uno studio di esposizione per via alimentare per calcolare un fattore di bioconcentrazione comparabile alle prove effettuate secondo il metodo di esposizione attraverso l'ambiente acquatico ([1]). Questa sezione esamina diversi approcci in tal senso, pur riconoscendo i limiti intrinseci a tali stime.

Lo studio per via alimentare misura la depurazione per ottenere la costante cinetica di depurazione, k_2. Se si può stimare la costante cinetica di assorbimento con i dati disponibili per la situazione in cui il pesce è stato esposto alla sostanza in esame attraverso l'ambiente acquatico, si potrà calcolare un BCF cinetico.

La stima di una costante cinetica di assorbimento per l'esposizione attraverso l'ambiente acquatico alla sostanza in esame si basa su numerose ipotesi, che contribuiscono tutte all'incertezza dei risultati. Inoltre, tale questo approccio per stimare un BCF presuppone che la velocità complessiva di depurazione (compresi i fattori rilevanti, quali la ripartizione nel corpo e i processi di depurazione individuali) sia indipendente dalla tecnica di esposizione utilizzata per produrre un carico corporeo della sostanza in esame.

Le principali ipotesi inerenti a tale approccio di stima possono essere riassunte come segue:

La depurazione a seguito di assunzione alimentare è la stessa della depurazione a seguito di esposizione attraverso l'ambiente acquatico a una determinata sostanza;

L'assorbimento attraverso l'ambiente acquatico segue una cinetica di primo ordine;

A seconda del metodo utilizzato per stimare l'assorbimento:

— l'assorbimento può essere correlato al solo peso del pesce;

— l'assorbimento può essere correlato al solo coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua della sostanza;

— l'assorbimento può essere correlato a una combinazione del peso del pesce e del coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua della sostanza;

— i fattori che in pratica possono influenzare l'assorbimento in una prova con esposizione in ambiente acquatico, quali la biodisponibilità della sostanza, l'adsorbimento verso l'apparecchiatura, la dimensione molecolare ecc., hanno un impatto limitato

— e, soprattutto:

La banca dati utilizzata per sviluppare il metodo di stima dell'assorbimento è rappresentativa della sostanza in esame.

Numerose pubblicazioni in letteratura riportano le equazioni che mettono in correlazione l'assorbimento di acqua nei pesci attraverso le branchie e il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua di una sostanza, il peso del pesce (1) (2) (3) (4), il volume e/o il contenuto lipidico, la permeabilità/diffusione delle membrane (5) (6), il volume di ventilazione dei pesci (7) e mediante un approccio fugacità/bilancio di massa (8) (9) (10). Una valutazione dettagliata di tali approcci in

([1]) In natura, il meccanismo che porta alla maggiore esposizione in ambiente acquatico è probabilmente l'ingestione di sostanze estremamente idrofobe; pertanto, un BCF stimato non è necessariamente rappresentativo del potenziale di bioaccumulo di tali sostanze.

▼M7

questo contesto figura in Crookes & Brooke (11). Una pubblicazione di Barber (12), che si è adoperato per modellizzare il bioaccumulo associato all'assunzione alimentare, si rivela utile in questo contesto, poiché comprende i contributi di modelli di cinetica di assorbimento attraverso le branchie. Anche una sezione del documento di riferimento sul protocollo alimentare del 2004 (13) è dedicata a questo aspetto.

Per la maggior parte, tali modelli sembrano elaborati a partire da banche dati limitate. Per quanto riguarda i modelli per i quali sono disponibili informazioni dettagliate sulle banche dati utilizzate per la loro elaborazione, sembra che i tipi di sostanze utilizzate presentino spesso una struttura simile o rientrino nella stessa classe (in termini di funzionalità, ad esempio i composti organoclorurati). Ciò aumenta l'incertezza di utilizzare un modello al fine di prevedere la costante cinetica di assorbimento per un tipo di sostanza diverso, in aggiunta a considerazioni specifiche alla prova quali le specie sperimentali, la temperature, ecc.

Una panoramica delle tecniche disponibili (11) mostra che nessuna metodologia è «più corretta» delle altre. Occorre pertanto giustificare chiaramente la scelta del modello utilizzato. Quando sono disponibili diversi metodi la cui applicazione può essere giustificata, è prudente presentare più di una stima di k_1 (e quindi del BCF) o un intervallo di valori di k_1 (e del BCF) secondo i diversi possibili metodi di stima dell'assorbimento. Tuttavia, date le differenze tra i tipi di modello e le banche dati utilizzate per svilupparli, non sarebbe opportuno adottare una media delle stime ottenute con questi diversi metodi.

Alcuni ricercatori ipotizzano che tali stime del fattore di bioconcentrazione (BCF) richiedano una correzione della biodisponibilità per tener conto dell'adsorbimento della sostanza rispetto al carbonio organico disciolto (DOC) in un ambiente acquatico, affinché la stima corrisponda ai risultati degli studi di esposizione in ambiente acquatico [ad esempio (13) (14)]. Tale correzione non è però necessariamente adeguata a causa dei bassi livelli di COD richiesti in uno studio con esposizione in ambiente acquatico per una stima nel «caso peggiore» (ossia il rapporto tra la sostanza biodisponibile e la sostanza misurata in soluzione). Con le sostanze estremamente idrofobe, l'assorbimento attraverso le branchie può essere limitato dal tasso di diffusione passivo in prossimità della superficie delle branchie; in tal caso, è possibile che la correzione tenga conto di questo effetto e non di quello che si voleva correggere.

È consigliabile concentrarsi sui metodi che richiedono dati di base facilmente disponibili sulle sostanze esaminate con il metodo di esposizione per via alimentare qui descritto (vale a dire il log Ko/w, e il peso dei pesci). Altri metodi che richiedono dati di base più complessi sono applicabili, ma potrebbero richiedere ulteriori misurazioni nel corso della prova o una conoscenza approfondita della sostanza in esame o sulle specie sperimentali che potrebbero essere difficili da ottenere. Inoltre, la scelta del modello può essere influenzato dal livello di validazione e dal campo di applicabilità (cfr. (11) per una panoramica e un raffronto dei diversi metodi).

Occorre tenere presente che la risultante stima di k_1 o il BCF stimato, sono valori incerti e potrebbero richiedere l'applicazione del «peso dell'evidenza» assieme al BMF ottenuto e ai parametri relativi alla sostanza (ad es. dimensione molecolare) per avere una visione d'insieme del potenziale di bioaccumulo di una sostanza. L'interpretazione e l'uso di tali parametri possono variare in funzione del quadro normativo.

BIBLIOGRAFIA

(1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 25: 1-14.

(2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. Aquat. Toxicol. 30: 325-341.

(3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined in vivo and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

▼M7

(4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. Environ. Toxicol. Chem. 22: 1963-1992.

(5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in Aquatic Toxicology and Environmental Fate, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.

(6) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343-2355.

(7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

(8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. Environ. Toxicol. Chem. 20: 1399-1420.

(9) Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. Environ. Sci. Technol. 31: 577-583.

(10) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. QSAR Comb. Sci. 22: 337-345.

(11) Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.

(12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. Environ. Toxicol. Chem. 27: 755-777

(13) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in Handbook of property estimation methods for chemicals, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Racton, FL, USA: 189-231.

▼B

C.14. TEST SULLA CRESCITA DEI PESCI GIOVANI

1. METODO

Questo metodo di test di tossicità sulla crescita corrisponde al TG 215 (2000) dell'OCSE.

1.1. INTRODUZIONE

L'obiettivo di questo test è valutare gli effetti dell'esposizione prolungata alle sostanze chimiche sulla crescita dei pesci giovani. Il test si basa su un metodo, sviluppato e sottoposto ad esercizi di intercalibrazione (ring test) (1) (3) all'interno dell'Unione europea, per valutare gli effetti delle sostanze chimiche sulla crescita di giovani di trota iridea (*Oncorynchus mykiss*) in condizioni di flusso continuo. È possibile utilizzare anche altre specie ben documentate. Per esempio, esistono esperienze di test sulla crescita con il danio zebrato (Danio rerio) ([1]) (2) (4) (5) e *Oryzias latipes* (6) (7) (8).

Cfr. anche Introduzione generale, parte C.

1.2. DEFINIZIONI

Minima concentrazione con effetto (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): è la più bassa concentrazione testata di una sostanza in esame alla quale si osserva un effetto significativo ($p < 0,05$) rispetto alla sostanza di controllo. Tuttavia, tutte le concentrazioni al di sopra della LOEC devono avere un effetto dannoso uguale o superiore a quelli osservati alla LOEC.

Massima concentrazione senza effetto (No Observed Effect Concentration, NOEC): concentrazione di prova immediatamente inferiore alla LOEC.

EC_x: in questo metodo di test è la concentrazione della sostanza in esame che provoca una variazione x % nel tasso di crescita dei pesci rispetto ai controlli.

Regime di carico: peso fresco dei pesci per volume di acqua.

Densità della popolazione: numero di pesci per volume di acqua.

Tasso di crescita specifico del singolo pesce: esprime il tasso di crescita di un individuo in base al suo peso iniziale.

Tasso di crescita specifico medio della vasca: esprime il tasso di crescita medio della popolazione di una vasca a una specifica concentrazione.

Tasso di crescita pseudo-specifico: esprime il tasso di crescita di un individuo rispetto al peso iniziale medio della popolazione della vasca.

([1]) Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231-236.

▼B

1.3. PRINCIPIO DEL METODO DI TEST

I pesci giovani in fase di crescita esponenziale vengono pesati e collocati in contenitori di prova e quindi esposti a un intervallo di concentrazioni subletali della sostanza in esame disciolta in acqua, preferibilmente in condizioni di flusso continuo o, ove non sia possibile, in adeguate condizioni semistatiche (statiche con rinnovo del medium). La durata del test è di 28 giorni. I pesci sono alimentati quotidianamente. La razione di cibo è basata sul peso iniziale dei pesci e può essere ricalcolata dopo 14 giorni. Al termine del test, i pesci vengono nuovamente pesati. Gli effetti sui tassi di crescita vengono analizzati tramite un modello di regressione per stimare la concentrazione che causerebbe una variazione x % del tasso di crescita, cioè EC_X (ad esempio EC_{10}, EC_{20} o EC_{30}). In alternativa, è possibile paragonare i dati con valori di controllo per determinare la minima concentrazione con effetto (LOEC) e di conseguenza la concentrazione senza effetto (NOEC).

1.4. INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

Dovrebbero essere disponibili i risultati di un test di tossicità acuta (cfr. metodo C.1) eseguito preferibilmente sulle stesse specie scelte per il presente test. Occorre pertanto che siano note la solubilità in acqua e la tensione di vapore della sostanza in esame e che sia disponibile un metodo analitico affidabile per la quantificazione della sostanza nelle soluzioni di prova, di cui devono essere noti e riportati i dati relativi all'accuratezza e al limite di rivelabilità.

Le informazioni utili comprendono: formula di struttura, purezza della sostanza, stabilità in acqua e alla luce, pK_a, P_{ow}- e risultati di un test di biodegradabilità immediata (cfr. metodo C.4).

1.5. VALIDITÀ DEL TEST

Perché il test sia valido devono realizzarsi le seguenti condizioni:

— la mortalità del/i controllo/i non deve superare il 10 % alla fine del test,

— il peso medio dei pesci di controllo deve essere aumentato a sufficienza da consentire di individuare la variazione minima del tasso di crescita considerata significativa. Un ring-test (3) ha dimostrato che, per la trota iridea, il peso medio dei pesci controlli deve essere aumentato, nei 28 giorni, di almeno la metà (50 %) del loro peso medio iniziale: ad esempio, peso iniziale:1 g/pesce (= 100 %), peso finale dopo 28 giorni: >1,5 g/pesce (≥ 150 %),

— la concentrazione dell'ossigeno disciolto deve essere rimasta almeno al 60 % del valore di saturazione in aria per tutta la durata del test,

— la temperatura dell'acqua non deve mai differire di oltre ± 1 °C fra i diversi contenitori, né fra i vari giorni e dovrebbe essere mantenuta in un intervallo di 2 °C entro gli intervalli di temperatura specificati per la specie utilizzata (allegato 1).

1.6. DESCRIZIONE DEL METODO

1.6.1. **Apparecchiatura**

Normale attrezzatura da laboratorio e in particolare:

— misuratori dell'ossigeno e del pH;

▼B

— attrezzatura per la determinazione della durezza e dell'alcalinità dell'acqua;

— apparecchiatura adeguata per il controllo della temperatura e preferibilmente per il monitoraggio continuo;

— vasche in materiale chimicamente inerte e di capacità adeguata in relazione al carico e alla densità di popolazione raccomandati (cfr. sezione 1.8.5 e appendice 1);

— bilancia sufficientemente precisa (precisione a ± 0,5 %).

1.6.2. **Acqua**

Per il test si può utilizzare qualunque tipo di acqua in cui la specie in esame dimostra di sopravvivere a lungo termine e di crescere in modo adeguato. La qualità dell'acqua deve essere costante per tutta la durata del test. Il pH deve essere compreso entro 6,5 e 8,5, ma nel corso di un dato test deve essere compreso entro un intervallo di ± 0,5 unità di pH. Si raccomanda una durezza superiore a 140 mg/l (come $CaCO_3$). Per evitare effetti indesiderati dell'acqua di diluizione sui risultati del test (ad esempio per complessazione della sostanza in esame), ad intervalli si dovrebbero prelevare campioni e analizzarli. La misura dei metalli pesanti (ad esempio Cu, Pb, Zn, Hg, Cd e Ni), dei principali anioni e cationi (ad esempio Ca, Mg, Na, K, Cl e SO_4), 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 è risultata costante per almeno un anno, le determinazioni possono essere effettuate con minore frequenza (ad esempio ogni sei mesi). Alcune caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione accettabile sono elencate nell'allegato 2.

1.6.3. **Soluzioni di prova**

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 di prova 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).

In alcuni casi può rendersi necessario l'utilizzo di solventi o disperdenti (agenti solubilizzanti) per ottenere una soluzione madre di adeguata concentrazione. A tale scopo si prestano, ad esempio, solventi quali acetone, eta-nolo, metanolo, dimetilsolfossido, dimetilformammide e glicole trietilenico o disperdenti quali Cremophor RH40. Tween 80, metilcellulosa 0,01 % e HCO-40. Quando si impiegano agenti a rapida biodegradabilità, come l'acetone, e/o altamente volatili è necessario procedere con cautela, poiché potrebbero causare problemi nelle prove a flusso continuo dovuti a sviluppo batterico Eventuali agenti solubilizzanti non devono avere effetti significativi sulla crescita dei pesci, né effetti negativi visibili sui giovani; come deve risultare da un controllo con solo solvente.

▼B

Per le prove a flusso continuo occorre un sistema che eroghi e diluisca in continuo una soluzione madre della sostanza in esame (ad esempio una pompa dosatrice, un diluitore proporzionale, un sistema di saturazione) per fornire alle camere di prova una serie di concentrazioni. Le portate di soluzione madre e acqua di diluizione dovrebbero essere controllate a intervalli, preferibilmente ogni giorno, e non devono variare di oltre il 10 % per tutta la durata del test. Un ring-test (3) ha dimostrato che, per la trota iridea, è accettabile una rimozione dell'acqua, durante il test, di 6 litri/g di pesce/die (cfr. sezione 1.8.2.2).

Per i test semistatici (con rinnovo), la frequenza di rinnovo del mezzo dipende dalla stabilità della sostanza in esame, ma si raccomanda di sostituire l'acqua quotidianamente. Se da test preliminari di stabilità (cfr. sezione 1.4) la concentrazione della sostanza in esame non risulta stabile (cioè è al di fuori dell' intervallo dell'80-120 % della concentrazione nominale o al di sotto dell'80 % della concentrazione iniziale misurata) durante l'intervallo di tempo tra due rinnovi dell'acqua, occorre prendere in considerazione l'uso di un test a flusso continuo.

1.6.4. **Selezione della specie**

La trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) è la specie raccomandata per questo test, in quanto la maggior parte dell'esperienza deriva da ring-test effettuati su questa specie (1) (3). È però possibile utilizzare altre specie ben documentate, ma in questo caso potrebbe essere necessario adattare la procedura sperimentale per fornire condizioni sperimentali adeguate. Ad esempio, sono state fatte esperienze anche con il danio zebrato (*Danio rerio*) (4) (5) e l'*Oryzias latipes* (6) (7) (8). In questo caso occorre motivare la scelta della specie e descrivere dettagliatamente il metodo sperimentale.

1.6.5. **Mantenimento dei pesci**

I pesci vanno selezionati da una popolazione di un solo stock, preferibilmente dalla stessa nidiata che sia stata mantenuta in condizioni di qualità dell'acqua e di illuminazione simili a quelle usate nel test per almeno due settimane prima della sperimentazione. Essi vanno alimentati con una razione minima quotidiana pari al 2 % del peso corporeo (razione quotidiana ideale = 4 % del peso corporeo) per tutto il periodo di mantenimento e durante il test.

Dopo un periodo di acclimatazione di 48 h si registra la mortalità e si applicano i seguenti criteri:

— mortalità di oltre il 10 % della popolazione in sette giorni: respingere l'intero lotto,

— 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.

Durante le due settimane precedenti il test e durante il test ai pesci non vanno somministrate sostanze terapeutiche.

▼B

1.7. DISEGNO SPERIMENTALE

Il «disegno sperimentale» comprende la selezione del numero delle concentrazioni di prova, e dell'intervallo fra esse, il numero di vasche per ciascun livello di concentrazione e il numero di pesci per vasca. Idealmente, il disegno sperimentale dovrebbe essere scelto tenendo conto dei seguenti aspetti:

— obiettivo dello studio;

— metodo di analisi statistica che verrà impiegato;

— disponibilità e costo delle risorse sperimentali.

Nel dichiarare l'obiettivo occorre possibilmente specificare il potere statistico a cui occorre rilevare una data differenza (ad esempio nel tasso di crescita) o, alternativamente, la precisione con cui occorre stimare la EC_X (ad esempio con x = 10, 20 o 30, comunque di preferenza non meno di 10). In assenza di questi dati è impossibile dare indicazioni precise sulle dimensioni dello studio.

È importante riconoscere che un disegno che risulta ottimale (ovvero utilizza al meglio le risorse) per un dato metodo di analisi statistica non è necessariamente ottimale per un altro metodo. Il disegno raccomandato per la stima della LOEC/NOEC non sarebbe pertanto lo stesso raccomandato per l'analisi con la regressione.

Nella maggior parte dei casi l'analisi di regressione è preferibile all'analisi della varianza per i motivi discussi da Stephan e Rogers (9). Comunque, qualora non si trovi un modello di regressione adeguato ($r^2 < 0,9$), si dovrebbe utilizzare la NOEC/LOEC.

1.7.1. **Disegno per l'analisi con la regressione**

Nel definire il disegno sperimentale di un test cui applicare l'analisi di regressione occorre considerare quanto segue:

— la concentrazione con effetto (ad esempio $EC_{10,20,30}$) e l'intervallo di concentrazioni a cui interessa l'effetto della sostanza in esame dovrebbero necessariamente essere compresi dalle concentrazioni incluse nel test. La precisione con cui si possono stimare le concentrazioni con effetto sarà maggiore quando la concentrazione con effetto è al centro dell'intervallo di concentrazioni da testare. Un test preliminare di ricerca dell'intervallo può risultare utile per selezionare le concentrazioni di prova più adeguate;

— per consentire l'intervallo di un modello statistico soddisfacente il test dovrebbe comprendere almeno una vasca di controllo e cinque vasche ulteriori a concentrazioni diverse fra loro. Se del caso, quando si utilizza un agente solubilizzante, occorre predisporre un controllo contenente l'agente solubilizzante alla più alta concentrazione utilizzata, oltre alla serie prevista dal test (cfr. sezioni 1.8.3 e 1.8.4);

— è possibile usare una serie geometrica adeguata allo scopo o una serie logaritmica (10) (cfr. allegato 3). E preferibile un intervallo logaritmico fra le concentrazioni sperimentali;

▼B

— se sono disponibili più di sei vasche, le vasche in eccedenza dovrebbero essere utilizzate come repliche o distribuite per tutto il intervallo di concentrazioni per ridurre gli intervalli tra le concentrazioni. Entrambi i metodi sono ugualmente accettabili.

1.7.2. **Disegno per la stima di una NOEC/LOEC mediante analisi della varianza (ANOVA)**

È preferibile che vi siano vasche di replica per ciascuna concentrazione e l'analisi statistica dovrebbe essere fatta a livello di vasca (11). La mancanza di vasche di replica non consente di tener conto della variabilità fra le vasche al di là di quella dovuta ai singoli pesci. Tuttavia, l'esperienza (12) ha dimostrato che, nel caso esaminato, la variabilità fra le vasche era molto bassa rispetto alla variabilità all'interno della vasca (ovvero fra i pesci). Pertanto un'alternativa relativamente accettabile è quella di effettuare l'analisi statistica a livello dei singoli pesci.

Di norma si utilizzano almeno cinque concentrazioni sperimentali in una serie geometrica con un fattore preferibilmente non superiore a 3,2.

Generalmente, quando si eseguono test con repliche, il numero di vasche di replica nel controllo e pertanto il numero di pesci dovrebbe corrispondere al doppio del numero in ciascuna delle concentrazioni sperimentali, che dovrebbero essere di dimensioni uguali (13) (14) (15). Per contro, in mancanza di repliche il numero di pesci nel gruppo di controllo dovrebbe essere uguale a quello in ciascuna concentrazione sperimentale.

Se l'ANOVA deve essere basata sulle vasche invece che sui singoli pesci [cosa che comporterebbe la marcatura individuale dei pesci o l'uso dei tassi di crescita «pseudo» specifici (cfr. sezione 2.1.2)], il numero di vasche di replica deve essere sufficiente per consentire la determinazione della deviazione standard delle «vasche all'interno delle concentrazioni». Ciò significa che i gradi di libertà dell'errore nell'analisi della varianza sono almeno 5 (11). Replicando solo i controlli si rischia di influenzare la variabilità dell'errore poiché essa può aumentare con il valore medio del tasso di crescita in questione. Poiché è probabile che il tasso di crescita diminuisca con l'aumentare della concentrazione, ciò tenderà a portare a una sovrastima della variabilità.

1.8. PROCEDURA

1.8.1. **Selezione e pesatura dei pesci da sottoporre al test**

È importante ridurre a! minimo la differenza di peso tra i pesci all'inizio del test. L'appendice 1 fornisce gli intervalli adeguati di misura per le diverse specie raccomandate per questo test. Per l'intero lotto di pesci utilizzato nel test, la differenza di peso tra i singoli individui all'inizio del test dovrebbe essere idealmente mantenuta entro ± 10 % del peso medio aritmetico e, in ogni caso, non deve superare il 25 %. Si raccomanda di pesare un sottocampione di pesci prima del test per stimare il peso medio.

▼B

La popolazione dello stock non va nutrita per 24 ore prima dell'inizio del test. Successivamente, i pesci vanno scelti in maniera casuale. Utilizzando un anestetico generale [ad esempio con una soluzione acquosa di 100 mg/l di metilsolfonato di tricaina (MS 222) neutralizzato con l'aggiunta di due parti di bicarbonato di sodio per parte di MS 222], occorre pesare individualmente i pesci asciugati per tamponamento come peso fresco alla precisione indicata nell'allegato 1. I pesci con pesi entro il intervallo desiderato vanno tenuti e quindi distribuiti a caso tra le vasche sperimentali. È necessario registrare il peso fresco totale dei pesci in ciascuna vasca sperimentale. L'impiego di anestetici e la manipolazione dei pesci (compresi l'asciugatura e la pesatura) possono provocare stress e lesioni nei pesci giovani, in particolare nelle specie di piccola taglia. I pesci giovani vanno pertanto maneggiati con la massima cura per evitare di stressare e danneggiare gli animali sperimentali.

I pesci vanno nuovamente pesati il giorno 28 del test (cfr. sezione 1.8.6). Se tuttavia si ritiene necessario ricalcolare la razione di cibo, i pesci possono essere pesati anche il giorno 14 del test (cfr. sezione 1.8.2.3). Per determinare i cambiamenti di dimensione dei pesci, su cui basarsi per adeguare le razioni di cibo, si possono utilizzare metodi diversi come quello fotografico.

1.8.2. **Condizioni di esposizione**

1.8.2.1. *Durata*

La durata del test è di ≥ 28 giorni.

1.8.2.2. *Regimi di carico e densità della popolazione*

È importante che il regime di carico e la densità della popolazione siano adeguate per la specie usata nel test (cfr. allegato 1). Se la densità della popolazione è eccessivamente alta, si verificherà uno stress da sovraffollamento, con conseguente diminuzione dei tassi di crescita e, verosimilmente, sviluppo di malattie. Se è eccessivamente bassa, è possibile che si induca un comportamento territoriale passibile di influenzare anche la crescita degli individui. In ogni caso il regime di carico dovrebbe essere sufficientemente basso da consentire di mantenere, senza areazione, una concentrazione di ossigeno disciolto pari ad almeno il 60 % del valore di saturazione in aria. Un ring test (3) ha dimostrato che, per la trota iridea, è accettabile un regime di carico di 16 trote di 3-5 g in un volume di 40 litri. La frequenza raccomandata di rimozione dell'acqua durante il test è di 6 litri/g di pesce/die.

1.8.2.3. *Alimentazione*

I pesci vanno nutriti con cibo adatto (allegato 1) in quantità sufficiente da indurre un tasso di crescita accettabile. Occorre evitare la crescita microbica e l'intorbidimento dell'acqua. Per la trota iridea una quantità quotidiana pari al 4 % del peso corporeo dovrebbe soddisfare queste condizioni (3) (16) (17) (18). La razione quotidiana può essere suddivisa in due porzioni uguali e offerta ai pesci in due pasti al giorno, a distanza di almeno 5 ore l'uno dall'altro. La razione si basa sul peso totale iniziale dei pesci per ciascuna vasca sperimentale. Se i pesci vengono pesati anche il giorno 14. la razione viene ricalcolata. Nelle 24 ore precedenti alla pesatura i pesci non dovrebbero essere nutriti.

▼B

Il cibo avanzato e il materiale fecale vanno rimossi dalle vasche sperimentali ogni giorno, pulendo con cura il fondo di ciascuna vasca con un aspiratore.

1.8.2.4. *Luce e temperatura*

Il fotoperiodo e la temperatura dell'acqua devono essere adatti alla specie utilizzata (allegato 1).

1.8.3. **Concentrazioni sperimentali**

Normalmente occorrono cinque concentrazioni della sostanza in esame, a prescindere dal disegno sperimentale scelto (cfr. sezione l.7.2). La conoscenza preliminare della tossicità della sostanza in esame (ad esempio mediante un test di tossicità acuta e/o uno studio di ricerca dell'intervallo di tossicità) dovrebbe essere d'aiuto nella selezione delle opportune concentrazioni sperimentali Se si utilizzano meno di cinque concentrazioni occorre spiegarne il motivo. La più alta concentrazione utilizzata nel test non deve superare il limite di solubilità in acqua della sostanza.

Se nella preparazione delle soluzioni madre si utilizza un agente solubilizzante, la sua concentrazione finale non deve superare 0,1 ml/l e, di preferenza, essere uguale in tutte le vasche (cfr. sezione 1.6.3). L'uso di tali materiali dovrebbe comunque essere evitato il più possibile.

1.8.4. **Controlli**

Il numero di controlli dell'acqua di diluizione dipende dal disegno sperimentale (cfr. sezioni 1.7-1.7.2). Se si utilizza un agente solubilizzante, il numero di controlli dell'agente solubilizzante deve corrispondere a quello dei controlli dell'acqua di diluizione.

1.8.5. **Frequenza delle determinazioni analitiche e delle misure**

Durante il test vanno determinate a intervalli regolari le concentrazioni della sostanza in esame (cfr. sotto).

Nei test a flusso continuo le portate del diluente e della soluzione madre della sostanza tossica dovrebbero essere controllati a intervalli, preferibilmente ogni giorno, e non dovrebbero variare di oltre il 10 % per tutta la durata del test. Quando si suppone che le concentrazioni della sostanza in esame siano entro ± 20 % dei valori nominali (cioè entro l'intervallo 80-120 %; cfr. sezioni 1.6.2 e 1.6.3), si raccomanda di analizzare, come minimo, la concentrazione minima e massima all'inizio del test e, successivamente, a intervalli settimanali. Per i test in cui non si ritiene che la concentrazione della sostanza in esame resti entro ± 20 % dei valori nominali (sulla base dei dati di stabilità relativi alla sostanza in esame), è necessario analizzare tutte le concentrazioni sperimentali, ma seguendo lo stesso regime.

Nei test semistatici (con rinnovo) in cui si suppone che la concentrazione della sostanza in esame resti entro ± 20 % dei valori nominali, si raccomanda di analizzare, come minimo, la concentrazione minima e massima appena preparate e subito prima del rinnovo, all'inizio dello studio e, successivamente, ogni settimana. Per i test in cui non si ritiene che la concentrazione della sostanza in esame resti entro ± 20 % dei valori nominali, si devono analizzare tutte le concentrazioni sperimentali seguendo lo stesso regime adottato per le sostanze più stabili.

▼B

Si raccomanda che i risultati siano basati sulle concentrazioni misurate. Se tuttavia vi sono prove che dimostrino che la concentrazione della sostanza in esame in soluzione è stata mantenuta in modo soddisfacente entro ± 20 % della concentrazione iniziale nominale o misurata per tutta la durata del test, allora i risultati possono essere basati sui valori nominali o misurati.

Qualora si rendesse necessario filtrare (ad esempio con pori di 0,45 μm) o centrifugare i campioni, la centrifugazione è la procedura raccomandata. Comunque, se il materiale da testare non assorbe ai filtri, può essere accettabile anche la filtrazione.

Durante il test l'ossigeno disciolto, il pH e la temperatura dovrebbero essere misurati in tutte le vasche sperimentali. La durezza totale, l'alcalinità e la salinità (se del caso) vanno misurate nei controlli e in una vasca alla concentrazione massima. L'ossigeno disciolto e, eventualmente la salinità, vanno misurati almeno tre volte (all'inizio, verso la metà e alla fine del test). Nei testi semistatici si raccomanda di misurare l'ossigeno disciolto con maggiore frequenza, preferibilmente prima e dopo ogni rinnovo dell'acqua o almeno una volta alla settimana. Il pH dovrebbe essere misurato all'inizio e alla fine di ogni rinnovo dell'acqua nei test semistatici e almeno una volta alla settimana nei test a flusso continuo. La durezza e l'alcalinità vanno misurate una sola volta per ciascun test. È auspicabile che la temperatura sia controllata continuamente in almeno in una vasca sperimentale.

1.8.6. **Osservazioni**

Peso: alla fine del test tutti i pesci sopravvissuti devono essere pesati come peso fresco dopo essere stati asciugati per tamponamento o in gruppo per ogni vasca sperimentale o singolarmente. La pesatura degli animali per vasca è preferibile a quella dei singoli individui, poiché evita di marcare i pesci uno per uno. Nel caso della misura individuale per la determinazione del tasso di crescita specifico di ogni singolo pesce, la tecnica di marcatura selezionata non deve causare stress agli animali (possono risultare adatte delle alternative alla marcatura per congelamento come ad esempio l'uso di una sottile lenza da pesca colorata).

I pesci dovrebbero essere esaminati ogni giorno durante il periodo di test ed eventuali anomalie esterne (quali emorragie, scoloramento) o comportamenti anomali dovrebbero essere registrati. Eventuali casi di mortalità vanno registrati e i pesci morti devono essere rimossi appena possibile. Questi non vanno sostituiti, in quanto il regime di carico e la densità della popolazione sono sufficienti per evitare effetti sulla crescita dovuti al cambiamento del numero di pesci per vasca. Sarà invece necessario adeguare la quantità di cibo somministrata.

2. DATI E RELAZIONE

2.1. TRATTAMENTO DEI RISULTATI

Si raccomanda di ricorrere ad uno statistico sia per la concezione del disegno sperimentale che per l'analisi statistica dei risultati del test, in quanto il metodo consente considerevoli variazioni, ad esempio nel numero di vasche e di concentrazioni di prova, nel numero dei pesci e così via. Viste le diverse opzioni di disegno sperimentale, in questa sede non si forniscono indicazioni specifiche sulle procedure statistiche.

▼B

Non vanno calcolati i tassi di crescita per le vasche in cui la mortalità supera il 10 %. Il tasso di mortalità dovrebbe però essere indicato per tutte le concentrazioni di prova.

Qualsiasi metodo venga utilizzato per l'analisi dei dati, il concetto centrale è il tasso di crescita specifico r fra il tempo t_1 e il tempo t_2. Esso può essere definito in vari modi, a seconda che i pesci siano marcati individualmente o meno, o che sia richiesta una media della vasca.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

dove,

r_1 = tasso di crescita specifico del singolo pesce

r_2 = tasso di crescita specifico medio della vasca

r_3 = tasso di crescita «pseudo» specifico

w_1, w_2 = pesi di un particolare pesce rispettivamente ai tempi t_1 e t_2

$\log_e w_1$ = logaritmo del peso di un singolo pesce all'inizio del periodo di studio

$\log_e w_2$ = logaritmo del peso di un singolo pesce alla fine del periodo di studio

$\log_e W_1$ = media dei logaritmi dei valori w_1 per i pesci nella vasca all'inizio del periodo di studio

$\log_e W_2$ = media dei logaritmi dei valori w_2 per i pesci nella vasca alla fine del periodo di studio

t_1, t_2 = tempo (giorni) all'inizio e alla fine del periodo di studio

r_1, r_2, r_3 possono essere calcolati per il periodo compreso fra i giorni 0 e 28 ed eventualmente (cioè quando è stata effettuata la misurazione al giorno 14) per i periodi fra i giorni 0 e 14 e 14 e 28.

2.1.1. **Analisi dei risultati con la regressione (modello concentrazione-risposta)**

Questo metodo di analisi trova una relazione matematica adeguata fra il tasso di crescita specifico e la concentrazione. e dunque consente la stima della «EC_X», ovvero qualsiasi valore di EC richiesto. Con questo metodo non è necessario calcolare r per ogni singolo pesce (r_1): l'analisi può invece essere basata sul valore di r medio per la vasca (r_2). Quest'ultimo metodo è preferibile, nonché più adatto nel caso si utilizzino le specie più piccole.

I tassi di crescita specifici medi per la vasca (r_2) dovrebbero essere riportati in grafico contro la concentrazione, allo scopo di esaminare la relazione concentrazione-risposta.

▼B

Per esprimere la relazione fra r_2 e la concentrazione occorre scegliere un modello adatto e la sua scelta deve essere sostenuta da opportune considerazioni.

Se il numero dei pesci sopravvissuti varia di vasca in vasca, il processo di adattamento del modello ai punti sperimentali (fitting) che sia semplice o non lineare, dovrebbe essere pesato per tenere conto delle diverse dimensioni dei gruppi.

Il metodo di adattamento del modello deve permettere di ricavare una stima, ad esempio, della EC_{20} e della sua dispersione (errore standard o intervallo di confidenza). Il grafico del modello trovato va presentato in relazione ai dati in modo tale da mostrare l'adeguatezza dell'adattamento (fit) del modello (9) (19) (20) (21).

2.1.2. **Analisi dei risultati per la stima della LOEC**

Se il test prevedeva repliche a tutti i livelli di concentrazione, la stima della LOEC può essere basata su un'analisi della varianza (ANOVA) del tasso di crescita specifico medio della vasca (cfr. sezione 2.1), seguita da un metodo adeguato [ad esempio il test di Dunnett o di Williams (13) (14) (15) (22)] di confronto tra l'r media per ciascuna concentrazione con l'r media per i controlli, allo scopo di identificare la concentrazione più bassa alla quale tale differenza risulti significativa a un livello di probabilità dello 0,05. Se non vengono soddisfatte le assunzioni richieste per i metodi parametrici — distribuzione non normale (ad esempio al test di Shapiro-Wilk) o varianza eterogenea (al test di Bartlett) —, potrebbe essere necessario trasformare i dati per rendere omogenee le varianze prima di eseguire l'ANOVA oppure effettuare un'ANOVA ponderata.

Se il test non comprendeva repliche a ciascuna concentrazione, un'ANOVA basata sulle vasche non sarà sensibile o risulterà impossibile. In tal caso un compromesso accettabile è quello di basare l'ANOVA sul tasso di crescita «pseudo» specifico r_3 dei singoli pesci.

L'r_3 medio di ciascuna concentrazione sperimentale può quindi essere paragonato con l'r_3 medio dei controlli. La LOEC può quindi essere identificata come in precedenza. Va detto che questo metodo non consente di tenere conto della variabilità fra le vasche, (né di salvaguardarsi da essa) ma solo di quella dovuta alla variabilità esistente fra i singoli pesci. Tuttavia, l'esperienza ha dimostrato (9) che la variabilità fra le vasche era molto piccola rispetto alla variabilità all'interno della vasca (cioè fra i pesci). Se nell'analisi non sono compresi i singoli pesci, occorre indicare il metodo di identificazione dei valori anomali e giustificarne l'utilizzo.

2.2. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati vanno interpretati con cautela nel caso in cui nelle soluzioni di prova si misurino concentrazioni di sostanze tossiche a livelli vicini al limite di rivelabilità del metodo analitico o, nei test semistatici, quando la concentrazione della sostanza in esame prima del rinnovo risulta diminuita rispetto alla soluzione appena preparata.

2.3. RELAZIONE SUL TEST

La relazione sul test deve contenere le seguenti informazioni:

▼B

2.3.1. **Sostanza in esame:**

— natura fisica e proprietà chimico-fisiche rilevanti,

— dati chimici di identificazione, compresi purezza e metodo analitico per la quantificazione della sostanza in esame, se del caso.

2.3.2. **Specie utilizzata:**

— nome scientifico, se possibile,

— ceppo, dimensioni, fornitore, eventuali pretrattamenti, ecc.

2.3.3. **Condizioni di esecuzione del test:**

— procedura sperimentale utilizzata (ad esempio semistatica con rinnovo, a flusso continuo, carico, densità della popolazione, ecc.),

— disegno sperimentale (ad esempio numero di vasche, concentrazioni e repliche, numero di pesci per vasca),

— metodo di preparazione delle soluzioni madre e frequenza di rinnovo (l'agente solubilizzante, se usato, va indicato insieme alla sua concentrazione),

— concentrazioni sperimentali nominali, medie dei valori misurati e loro deviazioni standard nelle vasche sperimentali nonché metodo con cui sono state calcolate e dimostrazione che le misure si riferiscono alle concentrazioni della sostanza in esame in soluzione vera,

— caratteristiche dell'acqua di diluizione: pH, durezza, alcalinità, temperatura, concentrazione di ossigeno disciolto, livelli di cloro residuo (se misurati), carbonio organico totale, solidi in sospensione, salinità del mezzo di prova (se misurata) ed eventuali altre misurazioni effettuate,

— qualità dell'acqua nelle vasche sperimentali: pH, durezza, temperatura e concentrazione dell'ossigeno disciolto,

— informazioni dettagliate sull'alimentazione (ad esempio tipo/i di cibo, origine, quantità somministrata e frequenza).

2.3.4. **Risultati:**

— dimostrazione che i controlli soddisfino i criteri di validità per la sopravvivenza, nonché dati sulla eventuale mortalità in tutte le concentrazioni sperimentali,

— tecniche di analisi statistica utilizzate, statistica basata sulle repliche o sui pesci, trattamento dei dati e giustificazione delle tecniche usate,

— dati tabulati sui pesi individuali e medi dei pesci nei giorni 0,14 (se misurati) e 28, valori dei tassi di crescita medi per vasca o pseudo specifici (a seconda del caso) per i periodi da 0 a 28 giorni o eventualmente da 0 a 14 e da 14 a 28,

— risultati dell'analisi statistica (analisi di regressione o ANOVA) preferibilmente mostrati in tabelle e grafici, nonché la LOEC ($p = 0,05$) e la NOEC o EC_x con gli errori standard, se possibile, a seconda dei casi,

▼B

— incidenza delle eventuali reazioni anomale da parte dei pesci e di eventuali effetti visibili indotti dalla sostanza in esame.

3. BIBLIOGRAFIA

(1) Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. WRc Report No PRD 1388-M/2.

(2) Meyer, A., Bierman, C. H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish *(Danio rerio),* a model System in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, pp. 231-236.

(3) Ashley S., Mallett M. J. and Grandy N. J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

(4) Crossland N. O. (198 5). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14. pp. 1855-1870.

(5) Nagel R.. Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M, Munk R., Scholz N. and Höfte B. B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish *(Brachydanio* reno): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, pp. 157-164.

(6) Yamamoto. Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio. Japan.

(7) Holcombe, G. \V., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the japanese medaka (Oryzias *latipes).* Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28. pp. 287-297.

(8) Benoit, D. A.. Holcombe, G. W. and Spehar. R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with japanese medaka (O*ryzias latipes).* Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.

(9) Stephan C. E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R. C. Bahner and D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 328-338.

(10) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmoni Conservation and Protection, Ontano, Report EPS l/RM/28, 81 pp.

(11) Cox D. R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

(12) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.

(13) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

▼B

(14) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp. 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, pp. 103-117.

(16) Johnston, W. L, Atkinson, J. L, Glanville N. T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, O*ncorhynchus mykiss:* effect of feeding level. Aquaculture 120, pp. 123-133.

(17) Quinton, J. C. and Blake. R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhvnchus mvkiss.* Journal of Fish Biology, 37, pp. 33-41.

(18) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 pp.

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

(20) DeGraeve, G. M, Cooney, J. M., Pollock, T. L, Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and McIntyre, D. O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.

(21) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

(22) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp. 510-531.

▼B

ALLEGATO 1

SPECIE DI PESCI RACCOMANDATE PER IL TEST E CONDIZIONI SPERIMENTALI ADEGUATE

Specie	Intervallo di temperatura raccomandalo (°C)	Fotoperiodo (ore)	Intervallo raccomandato per il peso iniziale dei pesci (g)	Precisione della misura richiesta	Regime di carico (g/l)	Densità della popolazione (per litro)	Cibo	Durata de! test (giorni)
Specie raccomandate:								
Oncorhynchus mykiss Trota iridea	12,5-16,0	12-16	1-5	Ai 100 mg più vicini	1,2-2,0	4	Cibo secco commerciale per avan-notti di salmonidi	≥ 28
Altre specie ben documentate:								
Danio rerio Danio zebrato	21-25	12-16	0,050-0,100	All'1 mg più vicino	0,2-1,0	5-10	Cibo vivo (Brachionus Artemia)	≥ 28
Oryzias latipes	21-25	12-16	0,050-0,100	All'1 mg più vicino	0,2-1,0	5-20	Cibo vivo (Brachionus Anemia)	≥ 28

02008R0440 — IT — 08.01.2026 — 011.001 — 917

▼B

ALLEGATO 2

ALCUNE CARATTERISTICHE CHIMICHE DI UN'ACQUA DI DILUIZIONE ACCETTABILE

Sostanza	Concentrazioni
Particolato	< 20 mg/l
Carbonio organico totale	< 2 mg/l
Ammoniaca non ionizzata	< 1 µg/l
Cloro residuo	< 10 µg/l
Pesticidi organofosforati totali	< 50 µg/l
Pesticidi organoclorurati totali più difenili policlorurati	< 50 µg/l
Cloro organico totale	< 25 µg/l

▼B

APPENDICE 3

Serie logaritmiche di concentrazioni adatte per i test di tossicità (9)

Colonna (numero di concentrazioni fra 100 e 10 o fra 10 e 1 [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

([1]) Da ciascuna colonna è possibile scegliere una serie di cinque (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/1 o ug/1). 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.

▼B

C.15. **PESCI, PROVA DI TOSSICITÀ A BREVE TERMINE SUGLI STADI DI EMBRIONI E DI LARVA CON SACCO VITELLINO**

▼M9

Questo metodo di prova è stato soppresso in quanto non è più riconosciuto come idoneo per generare informazioni sulle proprietà tossicologiche delle sostanze chimiche ai fini del regolamento (CE) n. 1907/2006. I metodi di prova applicabili per l'endpoint in questione figurano nella tabella 3 della parte 0.

▼B

C.16. **API MELLIFERE — TEST DI TOSSICITÀ ORALE ACUTA**

1. **METODO**

Questo metodo di test della tossicità acuta corrisponde al TG 213 (1998) dell'OCSE.

1.1. INTRODUZIONE

Questo test di tossicità è un metodo di laboratorio progettato per valutare la tossicità orale acuta dei fitofarmaci e di altre sostanze chimiche sulle api operaie adulte.

Per determinare e valutare le proprietà tossiche delle sostanze può rendersi necessario determinare la tossicità orale acuta sulle api, ad esempio in caso di probabile esposizione di api a una data sostanza. Il test di tossicità orale acuta viene eseguito per determinare la tossicità intrinseca dei pesticidi e di altre sostanze chimiche sulle api. In base ai risultati di tale test si valuta la necessità di effettuare analisi più approfondite. In particolare questo metodo può essere applicato per valutare i rischi che i pesticidi presentano per le api nell'ambito di un programma di test a più fasi che prevede in sequenza l'esecuzione di test in laboratorio, di esperimenti condotti parzialmente di semi-campo ed altri di campo (1). I pesticidi possono essere testati come principi attivi (p.a.) oppure come prodotti formulati.

Per verificare la sensibilità delle api e la precisione della procedura del test si utilizza una sostanza tossica standard.

1.2. DEFINIZIONI

Tossicità orale acuta: effetti avversi che si verificano entro un massimo di 96 ore dalla somministrazione orale di una dose singola della sostanza in esame.

Dose: quantità della sostanza di prova consumata, espressa in termini di massa (μg) della sostanza per animale sperimentale (μg/ape). Non è possibile calcolare la dose reale per ogni ape, in quanto le api vengono alimentate tutte insieme, ma si può fare una stima della dose media (sostanza consumata in totale/numero di api in una gabbia).

DL_{50} (Dose Letale Mediana) orale: dose singola, calcolata statisticamente, di una sostanza in grado di provocare la morte del 50 % degli animali se somministrata per via orale. Il valore della DL_{50} si esprime in μg di sostanza di prova per ape. Nel caso dei pesticidi la sostanza di prova può essere un principio attivo (p.a.) o un prodotto formulato contenente uno o più principi attivi.

Mortalità: si registra la morte di un animale quando l'esemplare resta completamente immobile.

1.3. PRINCIPIO DEL METODO UTILIZZATO

Si espongono api operaie adulte (*Apis mellifera*) a un range di dosi della sostanza in esame dispersa in soluzioni di saccarosio. Successivamente si alimentano le api con la stessa dieta, senza la sostanza in esame. Per almeno 48 ore si registra quotidianamente la mortalità e la si confronta con i valori di controllo. Se il tasso di mortalità aumenta fra le 24 ore e le 48 ore mentre la mortalità dei controlli resta a livelli accettabili, ovvero $\leq$ 10 %,. il test deve essere protratto fino a un massimo di 96 ore. Si analizzano i risultati per calcolare la DL_{50} a 24 ore e 48 ore e. nel caso lo studio venga prolungato, a 72 ore e 96 ore.

▼B

1.4. VALIDITÀ DEL TEST

Perché un test sia valido devono realizzarsi le seguenti condizioni:

— la mortalità media del numero totale dei controlli non deve superare il 10 % alla fine del test,

— la DL_{50} della sostanza tossica standard corrisponde al range specificato.

1.5. DESCRIZIONE DEL METODO UTILIZZATO

1.5.1. **Raccolta delle api**

Si utilizzano giovani api operaie adulte della stessa razza, della stessa età, alimentate allo stesso modo ecc. Le api vanno prelevate da colonie con regina, devono essere adeguatamente nutrite e sane e, per quanto possibile, esenti da malattie con storia e condizioni fisiologiche note. Possono essere raccolte la mattina del test o la sera prima e vanno tenute in condizioni sperimentali fino al giorno successivo. Si prestano a tale fine le api raccolte da telaini senza covata. È meglio evitare di raccogliere gli insetti all'inizio della primavera o alla fine dell'autunno, poiché in tali periodi il loro stato fisiologico è alterato. Dovendo eseguire i test all'inizio della primavera o alla fine dell'autunno, si possono tenere le api in un'incubatrice e allevarle per una settimana con polline raccolto dal favo e soluzione di saccarosio. Le api trattate con sostanze chimiche quali antibiotici, prodotti anti-Varroa ed altri non possono essere utilizzate nei test di tossicità prima di quattro settimane dalla fine dell'ultimo trattamento.

1.5.2. **Condizioni di mantenimento e alimentazione**

Si usano gabbie facili da pulire e ben ventilate di qualsiasi materiale adatto: acciaio inossidabile, reti di ferro, plastica o legno monouso. Il numero ideale è di dieci api per gabbia. Le dimensioni delle gabbie devono essere adeguate al numero di api per garantire uno spazio sufficiente.

Le api devono essere mantenute nell'oscurità in una stanza sperimentale a una temperatura di 25 ± 2 °C. L'umidità relativa (normalmente tra 50-70 %) va registrata durante tutto il test. Le procedure di manipolazione, compresi il trattamento e le osservazioni, possono essere condotte in presenza di luce (naturale). L'alimentazione è costituita da una soluzione di saccarosio in acqua ad una concentrazione finale di 500 g/l (50 % p/v). Dopo aver somministrato le dosi sperimentali, le api vanno alimentate per tutta la durata del test. Il sistema di alimentazione deve consentire di registrare l'assunzione di cibo per ogni gabbia (cfr. sezione 1.6.3.1). Come tale si può usare una pipetta di vetro (lunga 50 mm e larga 10 mm circa con l'estremità aperta ristretta a circa 2 mm di diametro).

1.5.3. **Preparazione delle api**

Le api raccolte vengono collocate per randomizzazione nelle gabbie, a loro volta poste in maniera randomizzata nella stanza sperimentale.

▼B

Prima di iniziare il test si possono lasciare le api a digiuno per un massimo di 2 ore. Si raccomanda di privare le api del cibo prima del trattamento in modo che all'inizio del test risultino tutte uguali per contenuto intestinale. Prima di cominciare il test occorre scartare le eventuali api moribonde e sostituirle con api sane.

1.5.4. **Preparazione delle dosi**

Se la sostanza di prova è un composto idromiscibile, la si può disperdere direttamente in una soluzione di saccarosio al 50 %. Per i prodotti tecnici e le sostanze a bassa idrosolubilità è possibile usare veicoli come i solventi organici, gli emulsionanti e i disperdenti scarsamente tossici per le api (quali acetone, dimetilformammide, dimetilsolfossido). La concentrazione del veicolo dipende dalla solubilità della sostanza di prova e deve essere uguale per tutte le concentrazioni testate. Generalmente, però, non si dovrebbe superare una concentrazione dell'1 %, che risulta essere la più appropriata.

Occorre preparare adeguate soluzioni di controllo; quando si utilizza un solvente o un disperdente per solubilizzare la sostanza vanno usati due gruppi di controllo separati: una soluzione in acqua e una soluzione di saccarosio con il solvente/veicolo alla concentrazione usata nelle soluzioni di dosaggio.

1.6. PROCEDURA

1.6.1. **Gruppi sperimentali e gruppi di controllo**

Il numero di dosi e di repliche testati deve soddisfare i requisiti statistici per la determinazione della DL_{50} con limiti di affidabilità del 95 %. Per il test sono di solito necessarie cinque dosi in serie geometriche, con un fattore non superiore a 2,2 e che coprano il range della DL_{50}. È tuttavia necessario determinare il fattore di diluizione e il numero di concentrazioni per dosaggio, in relazione alla pendenza della curva di tossicità (dose/mortalità) e tenendo conto del metodo statistico scelto per l'analisi dei risultati. Un test di ricerca del range permette di scegliere le concentrazioni adeguate per dosaggio.

Con ogni concentrazione utilizzata vanno effettuate almeno 3 repliche, ognuna di dieci api. Oltre alle serie sperimentali è necessario analizzare almeno tre lotti di controllo, ognuno di dieci api. Occorrono 3 gruppi di controllo anche per i solventi/veicoli usati (cfr. sezione 1.5.4).

1.6.2. **Sostanza tossica standard**

Nelle serie sperimentali deve essere inclusa una sostanza tossica standard. Occorre selezionare almeno tre dosi che coprano il valore atteso di DL_{50}. Per ciascuna dose si utilizzano almeno tre gabbie, ognuna contenente dieci api. La sostanza tossica di elezione è il dimetoato, per il quale la DL_{50} sulle 24 ore per somministrazione orale si colloca tra 0,10 e 0,35 µg p.a./ape (2). Tuttavia sono accettabili anche altre sostanze tossiche standard di cui occorre avere dati sufficienti per verificare la risposta attesa rispetto alla dose (ad esempio il parathion).

▼B

1.6.3. **Esposizione**

1.6.3.1. *Somministrazione delle dosi*

Ogni gruppo sperimentale di api deve ricevere 100-200 µl di soluzione di saccarosio/acqua al 50 % contenente la sostanza in esame alla concentrazione adeguata. Per i prodotti a bassa solubilità, bassa tossicità o bassa concentrazione nella formulazione è necessario aumentare il volume, in quanto vanno usate proporzioni maggiori nella soluzione di saccarosio. È necessario monitorare la quantità di cibo trattato consumato da ciascun gruppo. Una volta vuoto (in genere entro 3-4 ore), l'alimentatore va tolto dalla gabbia e sostituito con un altro contenente solo la soluzione di saccarosio. Le soluzioni di saccarosio vengono quindi somministrate ad libitum. Per alcune sostanze a concentrazioni elevate è possibile che le api rifiutino l'alimentazione trattata. Anche se le quantità consumate sono ridotte, dopo un massimo di 6 ore il cibo trattato non consumato va comunque sostituito con la soluzione di solo saccarosio. È necessario valutare la quantità di cibo trattato consumato (ad esempio con misurazione del peso/volume del cibo trattato rimanente).

1.6.3.2. *Durata*

Il test dovrebbe durare 48 ore dal momento della sostituzione della soluzione di prova con la soluzione di solo saccarosio. Se la mortalità continua ad aumentare di oltre il 10 % dopo le prime 24 ore, la durata del test va prolungata fino ad un massimo di 96 ore, sempre che la mortalità fra i controlli non superi il 10 %.

1.6.4. **Osservazioni**

La mortalità viene registrata 4 ore dopo l'inizio del test e in seguito dopo 24 ore e 48 ore dalla somministrazione della dose. In caso di prolungamento del periodo di osservazione occorre effettuare altre valutazioni a intervalli di 24 ore, fino a un massimo di 96 ore, sempre che la mortalità nei controlli non superi il 10 %.

E necessario stimare la quantità di cibo trattato consumato da ciascun gruppo. Il confronto fra la quantità consumata di cibo trattato e non trattato entro le 6 ore può fornire informazioni sulla gustosità della dieta trattata.

Vanno registrate tutte le anomalie del comportamento osservate durante il periodo di svolgimento del test.

1.6.5. **Test limite**

In alcuni casi (ad esempio quando si presume che la sostanza di prova sia poco tossica) si può eseguire un test limite utilizzando 100 µg p.a./ape per dimostrare che la DL_{50} è maggiore di tale valore. La procedura da seguire è la stessa, comprese le tre repliche per dose di prova, i controlli, la valutazione della quantità di cibo trattato consumato e l'uso della sostanza tossica standard. Se si verificano casi di mortalità occorre effettuare uno studio completo. Se si verificano effetti subletali, è necessario registrarli (cfr. sezione 1.6.4).

▼B

2. **DATI E RELAZIONE**

2.1. DATI

I dati vanno riassunti in una tabella che evidenzi il numero di api usate, la mortalità a ogni osservazione e il numero di api con comportamento anomalo per ogni gruppo di trattamento, di controllo e relativo alla sostanza tossica standard. Per analizzare i dati della mortalità occorrono metodi statistici adeguati (ad esempio analisi probit, media mobile, probabilità binomiale) (3) (4). Occorre tracciare curve dose-risposta per ogni tempo di osservazione raccomandato e calcolare le pendenze delle curve e le dosi letali mediane (DL_{50}) con limiti di affidabilità al 95 %. Le correzioni per la mortalità fra i controlli possono essere effettuate con il metodo di Abbott (4) (5). Quando il cibo trattato non viene consumato completamente è necessario determinare la dose della sostanza in esame consumata da ciascun gruppo. La DL_{50} va espressa in µg di sostanza di prova per ape.

2.2. RELAZIONE SUL TEST

La relazione sul test deve contenere le seguenti informazioni:

2.2.1. **Sostanza di prova:**

— natura fisica e proprietà fisico-chimiche rilevanti (ad esempio stabilità nell'acqua, tensione di vapore),

— dati chimici di identificazione, compresi formula di struttura, purezza (per i pesticidi: identità e concentrazione del/i principio/i attivo/i).

2.2.2. **Animali sperimentali:**

— nome scientifico della specie, razza, età approssimativa (in settimane), metodo e data di raccolta,

— informazioni sulle colonie usate per la raccolta, compresi stato di salute, eventuali malattie degli esemplari adulti, eventuali pre-trattamenti, ecc.

2.2.3. **Condizioni di esecuzione del test:**

— temperatura e umidità relativa della stanza sperimentale,

— condizioni di alloggiamento, compresi tipo, dimensioni e materiale delle gabbie,

— metodi di preparazione delle soluzioni madri e sperimentali (indicare eventuale solvente e relativa concentrazione),

— disegno sperimentale, ad esempio numero delle concentrazioni della sostanza in esame utilizzata, numero dei controlli; per ciascuna concentrazione e ciascun controllo, numero di gabbie e numero di api per gabbia,

— data del test.

▼B

2.2.4. **Risultati:**

— risultati dello studio preliminare di ricerca del range, se effettuato,

— dati primari: mortalità per ciascuna dose testata in funzione dei diversi tempi di osservazione,

— grafico delle curve dose-risposta alla fine del test,

— valori della DL_{50} con limiti di affidabilità al 95 %, per i singoli tempi di osservazione raccomandati per la sostanza di prova e la sostanza tossica standard,

— procedure statistiche usate per determinare la DL_{50},

— mortalità fra i controlli,

— altri effetti biologici osservati o misurati, quali comportamento anomalo delle api (compreso il rifiuto della dose sperimentale), quantità di cibo consumato nei gruppi trattati e non trattati,

— eventuali deviazioni dalle procedure sperimentali qui descritte ed eventuali altre informazioni pertinenti.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.l, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H.J., Mclndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp. U9-125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, pp. 265-267.

▼B

C.17. API MELLIFERE — TEST DI TOSSICITÀ ACUTA PER CONTATTO

1. METODO

Questo metodo di test della tossicità acuta corrisponde al TG 214 (1998) dell'OCSE.

1.1. INTRODUZIONE

Questo test di tossicità è un metodo di laboratorio progettato per valutare la tossicità acuta per contatto dei fitofarmaci e di altre sostanze chimiche sulle api operaie adulte.

Per determinare e valutare le proprietà tossiche delle sostanze può rendersi necessario determinare la tossicità acuta per contatto nelle api, ad esempio in caso di probabile esposizione di api a una data sostanza. Il test di tossicità acuta per contatto viene eseguito per determinare la tossicità intrinseca dei pesticidi e di altre sostanze chimiche sulle api. In base ai risultati di tale test si valuta la necessità di effettuare analisi più approfondite. In particolare questo metodo può essere applicato per valutare i rischi che i pesticidi presentano per le api nell'ambito di un programma di test a più fasi che prevede in sequenza l'esecuzione di test in laboratorio, di esperimenti condotti di semi-campo ed altri di campo (1). I pesticidi possono essere testati come principi attivi (p.a.) oppure come prodotti formulati.

Per verificare la sensibilità delle api e la precisione della procedura del test si utilizza una sostanza tossica standard.

1.2. DEFINIZIONI

Tossicità acuta per contatto: effetti avversi che si verificano entro un massimo di 96 ore dall'applicazione topica di una dose singola di una sostanza.

Dose: quantità della sostanza di prova applicata. La dose si esprime in termini di massa (μg) della sostanza per animale sperimentale (μg/ape).

DL_{50} (Dose Letale Mediana) per contatto: dose singola, calcolata statisticamente, di una sostanza in grado di provocare la morte del 50 % degli animali se somministrata per contatto. Il valore della DL_{50} si esprime in μg di sostanza di prova per ape. Nel caso dei pesticidi la sostanza di prova può essere un principio attivo (p.a.) o un prodotto formulato contenente uno o più principi attivi.

Mortalità: si registra la morte di un animale quando l'esemplare resta completamente immobile.

1.3. PRINCIPIO DEL METODO UTILIZZATO

Si espongono api operaie adulte (*Apis mellifera*) a un range di dosi della sostanza in esame disciolta in un veicolo adeguato, per applicazione diretta sul torace (goccioline). La durata del test è di 48 ore. Se il tasso di mortalità aumenta fra le 24 ore e le 48 ore mentre la mortalità dei controlli resta a livelli accettabili, ovvero ≤ 10 %, il test deve essere protratto fino a un massimo di 96 ore. La mortalità va registrata quotidianamente e confrontata con i valori di controllo. I risultati vengono analizzati per calcolare la DL_{50} a 24 ore e 48 ore e, nel caso lo studio sia prolungato, a 72 ore e 96 ore.

▼B

1.4. VALIDITÀ DEL TEST

Perché un test sia valido devono realizzarsi le seguenti condizioni:

— la mortalità media del numero totale dei controlli non deve superare il 10 % alla fine del test,

— la DL_{50} della sostanza tossica standard corrisponde al range specificato.

1.5. DESCRIZIONE DEL METODO UTILIZZATO

1.5.1. **Raccolta delle api**

Si utilizzano giovani api operaie adulte della stessa razza, della stessa età, alimentate allo stesso modo ecc. Le api vanno prelevate da colonie con regina, devono essere adeguatamente nutrite e sane e, per quanto possibile. esenti da malattie con storia e condizioni fisiologiche note. Possono essere raccolte la mattina del test o la sera prima e vanno tenute in condizioni sperimentali fino al giorno successivo. Si prestano a tale fine le api raccolte da telaini senza covata. È meglio evitare di raccogliere gli insetti all'inizio della primavera o alla fine dell'autunno, poiché in tali periodi il loro stato fisiologico è alterato. Dovendo eseguire i test all'inizio della primavera o alla fine dell'autunno, si possono tenere le api in un'incubatrice e allevarle per una settimana con polline raccolto dal favo e soluzione di saccarosio. Le api trattate con sostanze chimiche quali antibiotici, prodotti anti-Varroa ed altri non possono essere utilizzate nei test di tossicità prima di quattro settimane dalla fine dell'ultimo trattamento.

1.5.2. **Condizioni di mantenimento e alimentazione**

Si usano gabbie facili da pulire e ben ventilate di qualsiasi materiale adatto: acciaio inossidabile, reti di ferro, plastica, legno monouso, e così via. Le dimensioni delle gabbie devono essere adeguate al numero delle api per garantire uno spazio sufficiente. Si consiglia di mettere gruppi di dieci api per ogni gabbia.

Le api devono essere mantenute nell'oscurità in una stanza sperimentale a una temperatura di 25 ± 2 °C. L'umidità relativa (normalmente tra 50-70 %) va registrata durante tutto il test. Le procedure di manipolazione, compresi il trattamento e le osservazioni, possono essere condotte in presenza di luce (naturale). L'alimentazione, fornita per tutta la durata del test, è costituita da una soluzione di saccarosio in acqua ad una concentrazione finale di 500 g/l (50 % p/v) ed è somministrata tramite un alimentatore per api. Come tale si può usare una pipetta di vetro (lunga 50 mm e larga 10 mm circa con l'estremità aperta ristretta a circa 2 mm di diametro).

1.5.3. **Preparazione delle api**

Le api raccolte possono essere anestetizzate con anidride carbonica o azoto per l'applicazione della sostanza di prova. La quantità di anestetico e i tempi di esposizione devono essere minimi. Prima di cominciare il test occorre scartare le eventuali api moribonde e sostituirle con api sane.

1.5.4. **Preparazione delle dosi**

La sostanza di prova va applicata come soluzione in un veicolo, ad esempio un solvente organico o una soluzione acquosa con un agente umettante. Come solvente organico è preferibile l'acetone, ma si possono utilizzare, anche altri solventi organici {come la dimetilformammide e il dimetilsolfossido). Per i prodotti formulati dispersi in acqua e le sostanze organiche altamente polari non solubili in solventi organici può risultare più semplice applicare le soluzioni preparandole in una soluzione debole di un agente umettante comunemente in commercio (ad esempio Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Occorre preparare adeguate soluzioni di controllo: quando si utilizza un solvente o un disperdente per solubilizzare la sostanza, vanno usati due gruppi di controllo separati: uno trattato con acqua e l'altro con il solvente/disperdente.

1.6. PROCEDURA

1.6.1. **Gruppi sperimentali e gruppi di controllo**

Il numero di dosi e di repliche testati deve soddisfare i requisiti statistici per la determinazione della DL_{50} con limiti di affidabilità del 95 %. Per il test sono di solito necessarie cinque dosi in serie geometriche, con un fattore non superiore a 2,2 e che coprano il range della DL_{50}. È tuttavia necessario determinare il numero di dosi, in relazione alla pendenza della curva di tossicità (dose/mortalità) e tenendo conto del metodo statistico scelto per l'analisi dei risultati. Un test di ricerca del range permette di scegliere le dosi adeguate.

Con ogni concentrazione utilizzata vanno effettuate almeno tre repliche, ognuna di dieci api.

Oltre alle serie sperimentali è necessario analizzare almeno tre lotti di controllo, ognuno di dieci api. Dovendo utilizzare un solvente organico o un agente umettante occorre aggiungere altri tre lotti di controllo, di dieci api ciascuno, per il solvente o l'agente umettante.

1.6.2. **Sostanza tossica standard**

Nelle serie sperimentali deve essere inclusa una sostanza tossica standard. Occorre selezionare almeno tre dosi che coprano il valore atteso di DL_{50}. Per ciascuna dose si utilizzano almeno tre gabbie, ognuna contenente dieci api. La sostanza tossica di elezione è il dimetoato, per il quale la DL_{50} sulle 24 ore per contatto si colloca tra 0,10 e 0,30 µg p.a./ape (2). Tuttavia sono accettabili anche altre sostanze tossiche standard di cui occorre avere dati sufficienti per verificare la risposta attesa rispetto alla dose (ad esempio il parathion).

1.6.3. **Esposizione**

1.6.3.1. *Somministrazione delle dosi*

Le api vengono anestetizzate e trattate una per una con applicazione topica. L'assegnazione delle diverse dosi sperimentali e dei controlli è fatta per randomizzazione. Con un microapplicatore si applica 1 µl di soluzione contenente la sostanza di prova alla corretta concentrazione nella porzione dorsale del torace di ciascuna ape. Se si utilizza una quantità diversa, occorre precisarne le ragioni. Dopo l'applicazione le api vengono assegnate alle gabbie e alimentate con soluzioni di saccarosio.

1.6.3.2. *Durata*

Di preferenza, il test deve durare 48 ore. Se la mortalità aumenta di oltre il 10 % fra le 24 ore e le 48 ore, la durata del test va prolungata fino ad un massimo di 96 ore, sempre che la mortalità fra i controlli non superi il 10 %.

▼B

1.6.4. **Osservazioni**

La mortalità va registrata 4 ore dopo l'applicazione e, successivamente, alla ventiquattresima e quarantottesima ora. In caso di prolungamento del periodo di osservazione occorre effettuare altre valutazioni a intervalli di 24 ore, fino a un massimo di 96 ore, sempre che la mortalità fra i controlli non superi il 10 %.

E necessario registrare tutte le anomalie del comportamento osservate durante il test.

1.6.5. **Test limite**

In alcuni casi (ad esempio quando si presume che la sostanza di prova sia poco tossica) si può eseguire un test limite utilizzando 100 µg p.a./ape per dimostrare che la DL_{50} è maggiore di tale valore. La procedura da seguire è la stessa, comprese le tre repliche per dose di prova, i controlli e l'uso della sostanza tossica standard. Se si verificano casi di mortalità occorre effettuare uno studio completo. Se si verificano effetti subletali, è necessario registrarli (cfr. sezione 1.6.4).

2. **DATI E RELAZIONE**

2.1. DATI

I dati vanno riassunti in una tabella che evidenzi il numero di api usate, la mortalità a ogni osservazione e il numero di api con comportamento anomalo per ogni gruppo di trattamento, di controllo e relativo alla sostanza tossica standard. Per analizzare i dati della mortalità occorrono metodi statistici adeguati (ad esempio analisi probit, media mobile, probabilità binomiale) (3) (4). Occorre tracciare curve dose-risposta per ogni tempo di osservazione raccomandato {cioè 24 ore. 48 ore ed eventualmente 72 ore e 96 ore) e calcolare le pendenze delle curve e le dosi letali mediane (DL_{5O}) con limiti di affidabilità al 95 %. Le correzioni per la mortalità fra i controlli possono essere effettuate con il metodo di Abbott (4) (5). La DL_{50} va espressa in µg di sostanza di prova per ape.

2.2. RELAZIONE SUL TEST

La relazione sul test deve contenere le seguenti informazioni:

2.2.1. **Sostanza di prova:**

— natura fisica e proprietà fisico-chimiche (ad esempio stabilità nell'acqua, tensione di vapore).

— dati chimici di identificazione, compresi formula di struttura, purezza (per i pesticidi: identità e concentrazione del/i principio/i attivo.i).

2.2.2. **Animali sperimentali:**

— nome scientifico della specie, razza, età approssimativa (in settimane), metodo e data di raccolta,

— informazioni sulle colonie usate per la raccolta, compresi stato di salute, eventuali malattie degli esemplari adulti, eventuali pre-trattamenti. ecc.

▼B

2.2.3. **Condizioni di esecuzione del test:**

— temperatura e umidità relativa della stanza sperimentale,

— condizioni di alloggiamento, compresi tipo, dimensioni e materiale delle gabbie,

— metodi di somministrazione della sostanza di prova, ad esempio solvente veicolo usato, volume della soluzione di prova applicata, anestetici usati,

— disegno sperimentale, ad esempio numero delle dosi sperimentali usate, numero dei controlli; per ciascuna dose e ciascun controllo, numero di gabbie e numero di api per gabbia,

— data del test.

2.2.4. **Risultati:**

— risultati dello studio preliminare di ricerca del range, se effettuato,

— dati primari: mortalità per ciascuna concentrazione testata in funzione dei diversi tempi di osservazione,

— grafico delle curve dose-risposta alla fine del test,

— valori della DL_{50} con limiti di affidabilità al 95 %, per i singoli tempi di osservazione raccomandati per la sostanza di prova e la sostanza tossica standard,

— procedure statistiche usate per determinare la DL_{50},

— mortalità fra i controlli,

— altri effetti biologici osservati o misurati ed eventuali risposte anomale delle api,

— eventuali deviazioni dalle procedure del metodo sperimentale qui descritte ed eventuali altre informazioni pertinenti.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.l, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H.J., Mclndoe, E.C, Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield,). T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp. 265-267.

▼B

C.18. ADSORBIMENTO/DESORBIMENTO: METODO DISCONTINUO ALL'EQUILIBRIO

1. METODO

Il metodo discontinuo all'equilibrio qui descritto è una replica di: OECD TG 106 for the Determination of Soil Adsorption/Desorption, Using a Batch Equilibrium Method (2000).

1.1. INTRODUZIONE

Nell'elaborazione del presente metodo sono stati presi in conto i risultati di una sperimentazione circolare e di un workshop per la selezione dei terreni in vista della messa a punto di una prova di adsorbimento (1) (2) (3) (4), nonché le linee direttrici già esistenti sul piano nazionale (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Gli studi sull'adsorbimento/desorbimento sono utili per ottenere conoscenze essenziali in merito alla mobilità dei composti chimici e alla loro distribuzione nei comparti terreno, acqua ed aria della biosfera (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Queste conoscenze possono servire, per esempio, a prevedere o valutare la disponibilità di un prodotto chimico sotto vari aspetti: degradazione (22) (23); trasformazione ed assimilazione da parte degli organismi viventi (24); dilavamento attraverso il profilo del terreno (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28); volatilità a partire dal terreno (21) (29) (30); passaggio dalla superficie del terreno alle acque naturali (18) (31) (32). I dati sull'adsorbimento possono essere impiegati a fini di comparazione e di modellizzazione (19) (33) (34) (35).

La distribuzione di un prodotto chimico fra il terreno e le fasi acquose è un processo complicato, che dipende da svariati fattori: la natura chimica della sostanza (12) (36) (37) (38) (39) (40), le caratteristiche dei terreni (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) e i fattori climatici (precipitazioni, temperatura, luce solare, vento). I numerosi fenomeni e meccanismi coinvolti nel processo di adsorbimento di una sostanza chimica non possono essere definiti completamente attraverso un modello semplificato di laboratorio, sul tipo di quello qui proposto. Nondimeno, pur non permettendo di coprire tutti i casi che possono manifestarsi nella realtà, il presente tentativo fornisce informazioni utili sulla rilevanza ambientale dell'adsorbimento di una sostanza chimica.

Cfr. anche l'Introduzione generale.

1.2. CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo è destinato a valutare il comportamento di una data sostanza sotto l'aspetto del suo adsorbimento/desorbimento nei vari tipi di terreno. Esso ha lo scopo di ricavare un valore del sorbimento che possa essere impiegato per prevedere la ripartizione della sostanza entro un'intera gamma di condizioni ambientali; a tale fine, per ciascun prodotto chimico considerato, si procede a determinare i coefficienti di adsorbimento all'equilibrio su vari tipi di terreno, in funzione delle caratteristiche del terreno stesso (ad esempio contenuto in carbonio organico, contenuto in argilla, struttura, pH). Per coprire nel modo più ampio possibile le interazioni di una data sostanza con i suoli, nelle condizioni in cui essi si presentano effettivamente in natura, è necessario impiegare vari tipi di terreno.

Ai fini del presente metodo, per adsorbimento s'intende il processo col quale un prodotto chimico si lega alla superficie dei terreni; non viene fatta differenza fra i vari processi di adsorbimento (adsorbimento chimico e fisico) ed altri processi, come la degradazione catalitica in superficie, l'adsorbimento in massa o le reazioni chi-miche. Non si è tenuto conto dell'adsorbimento che si verifica sulle particelle colloidali (diametro $< 0{,}2$ μm) generate dai terreni.

▼B

Per i vari tipi di terreno, si è ritenuto che i parametri di maggiore importanza dal punto di vista dell'adsorbimento siano il contenuto in carbonio organico (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48), il contenuto in argilla e la struttura del terreno (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48), e, per i composti ionizzabili, il pH (3) (4) (42). Si è tenuto altresì conto: della capacità effettiva di scambio cationico (CESC), del contenuto in ossidi amorfi di ferro e di alluminio, particolarmente per i terreni vulcanici e tropicali (4), e della superficie specifica (49).

Il metodo è destinato a valutare l'adsorbimento di un prodotto chimico su vari tipi di terreno, entro una gamma variabile di contenuti di carbonio organico e di argilla, di struttura e di pH del terreno. Esso consiste in tre momenti:

Primo momento: studi preliminari destinati a determinare:

— il rapporto terreno/soluzione,

— il tempo di equilibrio per l'adsorbimento e la quantità della sostanza sotto esame che risulta adsorbita all'equilibrio,

— l'adsorbimento della sostanza sotto esame alla superficie dei recipienti e la stabilità della sostanza sotto esame lungo tutta la durata dell'esperimento.

Secondo momento: prova di selezione: l'adsorbimento viene studiato su cinque diversi tipi di terreno, attraverso la cinetica di adsorbimento a concentrazione singola e la successiva determinazione dei coefficienti di distribuzione K_d e K_{oc}.

Terzo momento: determinazione delle isoterme di adsorbimento di Freundlich, per determinare l'influenza della concentrazione sull'entità dell'adsorbimento nei terreni.

Studio di desorbimento attraverso la cinetica di desorbimento/isoterme di desorbimento di Freundlich (appendice 1).

1.3. DEFINIZIONI E UNITÀ

Simbolo	Definizione	Unità
A_{t_i}	percentuale di adsorbimento al tempo t_i	%
A_{eq}	percentuale di adsorbimento all'equilibrio di adsorbimento	%
$m_s^{ads}(t_i)$	massa della sostanza sotto esame adsorbita sul terreno al tempo t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	massa della sostanza sotto esame adsorbita sul terreno durante l'intervallo di tempo At_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	massa della sostanza sotto esame adsorbita sul terreno all'equilibrio di adsorbimento	µg
m_0	massa della sostanza sotto esame contenuta nella provetta, all'inizio della prova di adsorbimento	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	massa della sostanza sotto esame misurata in un'aliquota (v_a^A) al tempo t_i	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	massa della sostanza nella soluzione all'equilibrio di adsorbimento	µg
m_{soil}	quantità in massa della fase terreno, riferita al secco	g

▼B

Simbolo	Definizione	Unità
c_{st}	concentrazione di massa della soluzione di riserva della sostanza	µg cm^{-3}
C_0	concentrazione iniziale di massa della soluzione in esame a contatto col terreno	µg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	concentrazione di massa della sostanza nella fase acquosa al tempo t_i in cui l'analisi viene effettuata	µg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	contenuto della sostanza adsorbita sul terreno all'equilibrio di adsorbimento	µg cm^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	concentrazione di massa della sostanza nella fase acquosa all'equilibrio di adsorbimento	µg cm^{-3}
V_0	volume iniziale della fase acquosa a contatto col terreno durante la prova di adsorbimento	cm^3
v_a^A	volume dell'aliquota in cui viene misurata la sostanza sotto esame	cm^3
K_d	coefficiente di distribuzione per l'adsorbimento	cm^3 g^{-1}
K_{oc}	coefficiente di adsorbimento normalizzato per il carbonio organico	cm^3 g^{-1}
K_{om}	coefficiente di distribuzione normalizzato per la sostanza organica	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	coefficiente di adsorbimento secondo Freundlich	µg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
l/n	esponente di Freundlich	
D_{t_i}	percentuale di desorbimento al tempo t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	percentuale di desorbimento durante l'intervallo di tempo Δt_i	%
K_{des}	coefficiente apparente di desorbimento	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	coefficiente di desorbimento secondo Freundlich	µg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
$m_{aq}^{des}(t_i)$	massa della sostanza sotto esame desorbita dal terreno al tempo t_i	µg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	massa della sostanza sotto esame desorbita dal terreno durante l'intervallo di tempo Δt_i	µg
$m_m^{des}(eq)$	massa della sostanza determinata analiticamente nella fase acquosa all'equilibrio di desorbimento	µg
$m_{aq}^{des}(eq)$	massa totale della sostanza sotto esame desorbita all'equilibrio di desorbimento	µg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	massa della sostanza che resta adsorbita nel terreno dopo l'intervallo di tempo Δt_i	µg
m_{aq}^A	massa della sostanza residua dall'equilibrio di adsorbimento per effetto di una sostituzione incompleta del volume	µg
$C_s^{des}(eq)$	contenuto della sostanza sotto esame che rimane adsorbito sul terreno all'equilibrio di desorbimento	µg g^{-1}

▼B

Simbolo	Definizione	Unità
$C_{aq}^{des}(eq)$	concentrazione di massa della sostanza sotto esame presente nella fase acquosa all'equilibrio di desorbimento	µg cm^{-3}
V_T	volume totale della fase acquosa a contatto col terreno durante l'esperimento sulla cinetica di desorbimento effettuato col metodo in serie	cm^3
V_R	volume del surnatante eliminato dalla provetta dopo il raggiungimento di un equilibrio di adsorbimento e sostituito dallo stesso volume in una soluzione 0,01 M $CaCl_2$	cm^3
v_a^D	volume dell'aliquota prelevata a fini analitici dal tempo (i), durante l'esperimento sulla cinetica di desorbimento effettuato col metodo in serie	cm^3
$V_{ra}i^D$	volume della soluzione prelevata dalla provetta (i) per la misurazione della sostanza sotto esame, durante l'esperimento di cinetica di desorbimento (metodo in parallelo)	cm^3
V_r^F	volume della soluzione prelevata dal tubo per la misura della sostanza sotto esame all'equilibrio di desorbimento	cm^3
MB	bilancio di massa	%
m_E	massa totale della sostanza sotto esame estratta in due stadi dal terreno e dalle pareti del recipiente	µg
V_{rec}	volume del surnatante recuperato dopo che è stato raggiunto l'equilibrio di adsorbimento	cm^3
p_{ow}	coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua	
pKa	costante di dissociazione	
S_w	solubilità in acqua	g l^{-1}

1.4. PRINCIPIO DEL METODO

Volumi noti di soluzioni della sostanza sotto esame, non marcata o radiomarcata, a concentrazioni note in $CaCl_2$0,01 M, vengono aggiunti a campioni di terreno di peso secco noto, previamente equilibrati in $CaCl_2$0,01 M. La miscela viene agitata per un tempo adeguato. Le sospensioni di terreno vengono quindi separate per centrifugazione e facoltativa filtrazione, e si procede all'analisi della fase acquosa. La quantità di sostanza sotto esame adsorbita sul campione di terreno viene calcolata per differenza fra la quantità di sostanza sotto esame contenuta inizialmente nella soluzione e la quantità che rimane alla fine dell'esperimento (metodo indiretto).

Un altro metodo per determinare la quantità adsorbita della sostanza sotto esame è quello di analizzare direttamente il terreno (metodo diretto). Questo procedimento, che comporta un'estrazione per stadi successivi dei terreni mediante un appropriato solvente, è raccomandabile quando le differenze di concentrazione della soluzione della sostanza non possono essere determinate con precisione (casi possibili: adsorbimento della sostanza sotto esame sulla superficie dei recipienti nei quali ha luogo l'esperimento; instabilità della sostanza entro la durata dell'esperimento; adsorbimento debole, che dà luogo soltanto a piccole variazioni di concentrazione nella soluzione; adsorbimento energico, che conduce a basse concentrazioni non determinabili con esattezza). Se si impiega una sostanza radiomarcata, l'estrazione del terreno può essere evitata analizzando la fase terreno con la tecnica della combustione e successiva conta delle scintillazioni in fase liquida. Quest'ultima tecnica, peraltro, manca di specificità e non permette di distinguere i prodotti progenitori da quelli della trasformazione, e perciò dovrebbe essere riservata ai casi in cui il prodotto chimico sotto esame rimane stabile per tutta la durata dello studio.

▼B

1.5. INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA SOTTO ESAME

I reattivi chimici debbono essere di purezza analitica. Si raccomanda l'impiego di sostanze non marcate, a composizione nota e preferibilmente di purezza non inferiore al 95 %, oppure di sostanze radiomarcate a composizione e radiopurezza note. Nel caso dei radiomarcatori a semivita breve si terrà conto della degradazione apportando adeguate correzioni.

Prima di eseguire una prova per l'adsorbimcnto-desorbimento, è necessario disporre dei seguenti dati relativi alla sostanza sotto esame:

a) solubilità in acqua (A.6);

b) tensione di vapore (A.4) e/o costante della legge di Henry;

c) degradazione abiotica: idrolisi in funzione del pH (C.7);

d) coefficiente di ripartizione (A.8);

e) biodegrabilità rapida (C.4) o trasformazione aerobica ed anaerobica nel terreno;

f) pKa delle sostanze ionizzabili;

g) fotolisi diretta nell'acqua (cioè spettro di assorbimento UV-Vis nell'acqua, rendimento quantico) e fotodegradazione nel terreno.

1.6. APPLICABILITÀ

La prova può essere eseguita sulle sostanze chimiche per le quali si dispone di un metodo analitico sufficientemente preciso. La stabilità della sostanza sotto esame durante il tempo necessario per l'esecuzione della prova è un parametro importante, capace di influenzare l'attendibilità dei risultati, specialmente quando si applica il metodo indiretto. Pertanto, è necessario verificare detta stabilità attraverso uno studio preliminare; se nell'ordine di durata della prova si osserva una trasformazione, si raccomanda di eseguire lo studio principale analizzando tanto la fase terreno quanto la fase acquosa.

L'esecuzione di questa prova su sostanze a bassa solubilità in acqua ($S_W < 10^{-4}$ g l^{-1}) e su sostanze a carica elevata può dar luogo a difficoltà, dovute al fatto che la concentrazione nella fase acquosa non può essere misurata analiticamente con sufficiente precisione. In questi casi debbono essere introdotti passaggi intermedi. Il modo di affrontare questi problemi è descritto dove di rilevanza nel presente documento.

Sperimentando su sostanze volatili, si avrà cura di evitare le perdite durante lo studio.

1.7. DESCRIZIONE DEL METODO

1.7.1. **Apparecchiature e reattivi chimici**

Normale apparecchiatura di laboratorio, e in particolare:

a) provette o recipienti per eseguire l'esperimento. È importante che essi:

— siano adattabili direttamente alla centrifuga, in modo da minimizzare le perdite per manipolazione o travaso,

— siano costituiti da materiale inerte, tale cioè che l'adsorbimento della sostanza sotto esame sulla loro superficie sia minimo;

▼B

b) agitatore od apparecchio equivalente, capace di mantenere il terreno in sospensione durante l'agitazione;

c) centrifuga, di preferenza ad alta velocità (capace per esempio di produrre più di 3 000 g), a temperatura controllabile e che permetta di eliminare dalla soluzione acquosa le particelle di diametro superiore a 0,2 μm. Durante l'agitazione e la centrifugazione i contenitori dovranno essere mantenuti coperti, per evitare le perdite di liquido e quelle dovute alla volatilità; per rendere minimo l'adsorbimento sui coperchi, questi dovranno essere disattivati (ad esempio: coperchi a vite rivestiti di teflon);

d) facoltativi: apparecchio da filtrazione; filtri con porosità da 0,2 μm, sterili, per uso unico. Si avrà particolare cura di scegliere il materiale filtrante in modo da evitare che esso possa provocare perdite della sostanza sotto esame; per le sostanze scarsamente solubili non è opportuno impiegare materiale filtrante organico;

e) strumentazione analitica, adatta a misurare la concentrazione della sostanza sotto esame;

f) stufa da laboratorio, capace di mantenere una temperatura compresa fra 103 °C e 110 °C.

1.7.2. **Caratterizzazione e selezione dei terreni**

I terreni debbono essere caratterizzati attraverso tre parametri, dai quali si ritiene dipendere principalmente la loro capacità di adsorbimento: carbonio organico, contenuto in argilla e struttura del terreno, pH. Come già indicato (cfr. «Campo di applicazione»), va peraltro presa in considerazione ogni altra caratteristica chimico-fisica dei terreni che possa avere effetti sull'adsorbimento/desorbimento di una particolare sostanza.

I metodi impiegati per la caratterizzazione sono molto importanti e possono avere un influsso significativo sui risultati. Si raccomanda pertanto di misurare il pH del terreno in una soluzione in $CaCl_2$ 0,01 M (cioè nella soluzione usata per la prova di adsorbimento/desorbimento), secondo il corrispondente metodo ISO (ISO-10390-1). Si raccomanda inoltre di determinare le altre proprietà rilevanti del terreno attraverso metodi standard (esempio manuale ISO di analisi dei terreni «Hanbook of Soil Analysis»); in questo modo, l'analisi dei dati sul sorbimento potrà basarsi su parametri dei terreni standardizzati globalmente. I riferimenti bibliografici (50-52) forniscono alcune indicazioni sui metodi standard disponibili per l'analisi e la caratterizzazione dei terreni. Per la taratura dei metodi di prova dei terreni, si raccomanda l'impiego di terreni di riferimento.

La tabella 1 fornisce indicazioni per la scelta dei terreni in vista degli esperimenti di adsorbimento/desorbimento. I sette terreni prescelti coprono i tipi di terreni che si incontrano nelle zone geografiche temperate. Quando le sostanze sotto prova sono ionizzabili, i terreni scelti debbono coprire una vasta gamma di pH, in modo da potersi valutare l'adsorbimento della sostanza nelle sue forme ionizzata e non ionizzata. Indicazioni sul numero di terreni diversi da impiegare nelle varie fasi della prova sono fornite al punto 1.9 («Esecuzione dell'esperimento»).

Se si preferiscono altri tipi di terreno, questi debbono essere caratterizzati dagli stessi parametri, e le loro proprietà debbono variare analogamente a quelle indicate nella tabella 1, anche se non corrispondono esattamente ai criteri.

▼B

Tabella 1

Guida per la selezione dei campioni di terreno per l'adsorbimento-desorbimento

Tipo di terreno	Campo di pH (in $CaCl_2$ 0,01 M)	Contenuto in carbonio organico	Contenuto in argilla (%)	Composizione del terreno (1)
1	4,5-5,5	1,0-2,0	65-80	argilla
2	> 7,5	3,5-5,0	20-40	limo argilloso
3	5,5-7,0	1,5-3,0	15-25	limo sedimentario
4	4,0-5,5	3,0-4,0	15-30	limo
5	< 4,0-6,0 (2)	< 0,5-1,5 (2) (3)	< 10-15 (2)	sabbia limacciosa
6	> 7,0	< 0,5-1,0 (2) (3)	40-65	limo argilloso/argilla
7	< 4,5	> 10	< 10	sabbia/sabbia limacciosa

(1) Secondo il sistema FAO e quello US (85).
(2) Le rispettive variabili debbono mostrare di preferenza valori rientranti nel campo indicato. Se tuttavia risultasse difficile trovare materiali appropriati, sono accettabili valori inferiori al minimo indicato.
(3) I terreni contenenti meno dello 0,3 % di carbonio organico possono perturbare la correlazione fra il contenuto organico e l'adsorbimento. Si raccomanda perciò l'impiego di terreni a contenuto di carbonio organico non inferiore allo 0,3 %.

1.7.3. **Raccolta e conservazione dei campioni di terreno**

1.7.3.1. *Raccolta*

Per il campionamento non si raccomandano tecniche o strumenti specifici; la tecnica di campionamento dipende dalle finalità dello studio (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Va tenuto presente quanto segue:

a) è necessario disporre di informazioni particolareggiate sui precedenti della località dove ha luogo il prelievo, riguardanti il manto vegetale, i trattamenti con antiparassitari e/o fertilizzanti, gli ammendamenti biologici o la contaminazione accidentale, e le loro localizzazioni. Quanto alla descrizione del luogo di prelievo vanno seguite le raccomandazioni della norma ISO sul campionamento dei terreni (ISO 10381-6);

b) il luogo di campionamento deve essere definito secondo il metodo UTM (Proiezione universale traversa di Mercatore/dato orizzontale europeo) od attraverso le sue coordinate geografiche; ciò permetterà di eseguire futuri prelievi dello stesso terreno e contribuirà a definire il terreno a norma dei vari sistemi di classifica impiegati nei vari paesi. Si raccoglierà esclusivamente l'orizzonte A fino a una profondità massima di 20 cm. Con particolare riguardo al terreno n. 7, se del terreno fa parte un orizzonte O_h, questo deve essere incluso nel campionamento.

I campioni di terreno debbono essere trasportati entro contenitori, ed in condizioni di temperatura, tali da impedire che le proprietà iniziali del terreno risultino significativamente alterate.

▼B

1.7.3.2. *Conservazione*

È da preferirsi l'impiego di terreni prelevati di recente. Soltanto quando ciò non fosse possibile si potranno utilizzare terreni conservati a temperatura ambiente, al secco e all'asciutto. Per la conservazione non si raccomandano particolari limiti di tempo, ma i terreni conservati per più di tre anni saranno rianalizzati prima dell'impiego, per verificarne il contenuto in carbonio organico, il pH e il CESC.

1.7.3.3. *Manipolazione e preparazione dei campioni di terreno per la prova*

I terreni debbono essere essiccati all'aria a temperatura ambiente (di preferenza fra 20 e 25 ^{o}C). La disgregazione deve essere effettuata applicando la minima forza possibile, in modo da non alterare sensibilmente la struttura originale del terreno. I terreni saranno setacciati fino a granulometria < 2 mm; seguendo le raccomandazioni della norma ISO sul campionamento dei terreni (ISO 10381-6). Si raccomanda un'accurata omogeneizzazione, in quanto essa giova alla riproducibilità dei risultati. Il contenuto di umidità di ciascun terreno viene determinato su tre aliquote, per riscaldamento a 105 ^{o}C fino a peso sensibilmente costante (12 ore circa). Per tutti i calcoli, la massa del terreno va riferita alla massa essiccata in stufa, cioè al peso del terreno corretto per il suo contenuto di umidità.

1.7.4. **Preparazione della sostanza sotto esame per l'applicazione al terreno**

La sostanza sotto esame viene sciolta in una soluzione 0,01 M di $CaCl_2$ in acqua distillata o deionizzata; la soluzione di $CaCl_2$ .impiegata come fase acquosa solvente serve a migliorare la centrifugabilità ed a rendere minimo lo scambio di cationi. La concentrazione della soluzione di riserva deve di preferenza superare di tre ordini di grandezza il limite di rivelazione del metodo analitico applicato: ciò salvaguarda l'esattezza delle misure effettuate secondo la metodologia qui descritta. La concentrazione della soluzione di riserva deve inoltre essere inferiore alla solubilità in acqua della sostanza sotto esame.

Di preferenza, la soluzione di riserva deve essere preparata estemporaneamente al momento dell'applicazione ai campioni di terreno ed essere mantenuta ben chiusa e al buio, alla temperatura di 4 ^{o}C. Il tempo di conservazione dipende dalla stabilità della sostanza sotto esame e dalla sua concentrazione nella soluzione.

Soltanto nel caso delle sostanze scarsamente solubili ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}) può essere necessario ricorrere a un agente di solubilizzazione. Quest'ultimo: a) deve essere miscibile con l'acqua (ad esempio metanolo, acetonitrile); b) la sua concentrazione non deve superare l'1 % del volume totale della soluzione di riserva ed essere inferiore a quella della soluzione della sostanza sotto esame che verrà a contatto col terreno (di preferenza meno dello 0,1 %); c) non deve avere carattere di tensioattivo o dar luogo a reazioni solvolitiche con la sostanza chimica sotto esame. L'impiego di un agente di solubilizzazione deve essere menzionato e giustificato nella relazione.

Un'altra possibilità per le sostanze scarsamente solubili consiste nell'aggiunta intenzionale della sostanza sotto esame al sistema di prova: la sostanza sotto esame viene disciolta in un solvente organico, un'aliquota del quale viene aggiunta al sistema terreno (soluzione 0,01 M di $CaCl_2$ in acqua distillata o deionizzata). Il contenuto del solvente organico nella fase acquosa deve essere mantenuto al più basso livello possibile, in modo da non superare lo 0,1 %. L'addizione intenzionale di una soluzione organica può compromettere la riproducibilità sotto l'aspetto del volume: essa introdurrebbe un ulteriore fattore di errore, in quanto le concentrazioni della sostanza sotto esame e del cosolvente non sarebbero le stesse in tutte le prove.

▼B

1.8. PREREQUISITI PER L'ESECUZIONE DELLA PROVA DI ADSORBIMENTO/DESORBIMENTO

1.8.1. **Il metodo analitico**

Fra i parametri chiave capaci di influenzare la precisione delle misure di sorbimento sono compresi la precisione dei metodi impiegati per analizzare la soluzione e la fase adsorbita, la stabilità e la purezza della sostanza da esaminare, il raggiungimento di un equilibrio di sorbimento, l'ordine di grandezza delle variazioni di concentrazione della soluzione, il rapporto terreno/soluzione e le variazioni di struttura del terreno durante i processi di equilibrazione (35) (59-62). Alcuni esempi, focalizzati sulla precisione, sono riportati nell'appendice 2.

L'attendibilità del metodo analitico nell'intervallo di concentrazioni che è verosimile incontrare durante la prova deve essere controllata. Lo sperimentatore deve essere libero di mettere a punto un metodo appropriato sotto gli aspetti dell'esattezza, della precisione, della riproducibilità, dei limiti di rivelazione e del recupero. La tecnica sperimentale appresso descritta costituisce una guida per l'esecuzione della prova.

Un adeguato volume (ad esempio 100 cm^3) di $CaCl_2$ 0,01 M viene agitato per 4 ore insieme a un'adeguata massa (ad esempio 20 g) di terreno ad elevata capacità di adsorbimento, vale a dire ad elevato contenuto di carbonio organico e di argilla. Le masse e i volumi possono variare secondo le esigenze analitiche, ma un rapporto terreno/soluzione di 1 a 5 può rappresentare un punto di partenza adeguato. La miscela viene centrifugata, e la fase acquosa viene filtrata. A quest'ultima viene aggiunto un determinato volume della soluzione di riserva della sostanza sotto esame, in modo da ottenere una concentrazione nominale rientrante nel campo di concentrazioni che è verosimile incontrare durante la prova. Il volume non deve superare il 10 % del volume finale della fase acquosa, allo scopo di modificare il meno possibile la natura della soluzione di pre-equilibrazione. Si procede quindi all'analisi della soluzione.

Per tener conto delle sostanze artificiali impiegate nel metodo analitico e degli effetti matrice causati dal terreno va previsto un «bianco», consistente nel solo sistema terreno + soluzione di $CaCl_2$, senza aggiunta della sostanza sotto esame.

Per le misure di sorbimento si possono impiegare la cromatografia gas-liquido (GLC), la cromatografia in fase liquida ad alta pressione (HPLC), la spettrometria (ad esempio GC/spettrometria di massa, HPLC/spettrometria di massa) e la conta delle scintillazioni in fase liquida (per le sostanze radiomarcate). Indipendentemente dalla sua natura, un metodo analitico può ritenersi adeguato se il recupero è compreso fra il 90 % e il 110 % del valore nominale. Per consentire l'identificazione e la quantificazione dopo la ripartizione, i limiti di rivelazione del metodo analitico dovrebbero essere almeno due ordini di grandezza al di sotto della concentrazione nominale.

Le caratteristiche e i limiti di rivelazione del metodo analitico utilizzato per eseguire gli studi sull'adsorbimento sono importanti per definire le condizioni sperimentali e l'intera esecuzione dell'esame. Il presente metodo segue uno schema sperimentale generale e fornisce raccomandazioni e linee direttrici in vista di soluzioni alternative laddove la metodica analitica e le disponibilità di laboratorio imponessero limitazioni.

▼B

1.8.2. **Selezione dei rapporti ottimali terreno/soluzione**

Negli studi sui fenomeni di sorbimento, la scelta dei rapporti terreno/soluzione dipende dal coefficiente di distribuzione K_d e dal grado relativo di adsorbimento desiderato. La variazione di concentrazione della sostanza in soluzione determina la precisione statistica della misura, la quale dipende dalla forma dell'equazione di adsorbimento e, per quanto riguarda la rivelazione della concentrazione della sostanza chimica in soluzione, dalle limitazioni della metodologia analitica applicata. Pertanto, nella pratica generale, è utile adottare un numero limitato di rapporti fissi, nei quali la percentuale adsorbita sia superiore al 20 % e, meglio ancora, al 50 % (62); al tempo stesso si avrà cura che la concentrazione della sostanza sotto esame nella fase acquosa rimanga sempre abbastanza alta da poter essere misurata con precisione. Ciò ha particolare importanza quando le percentuali di adsorbimento sono elevate.

Un modo conveniente per scegliere i rapporti terreno/acqua più appropriati comincia da una valutazione di K_d attraverso studi preliminari o secondo tecniche di valutazione che abbiano dato buona prova (appendice 3). Il rapporto appropriato può quindi essere scelto in base a un grafico del rapporto terreno/soluzione in funzione di K_d per determinate percentuali fisse di adsorbimento (fig. 1). Tale grafico è basato sul presupposto che l'equazione di adsorbimento sia lineare ([1]). La relazione applicabile si ottiene rielaborando l'equazione 4 del K_d nella forma dell'equazione 1:

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1\right) K_d \qquad (1)$$

ovvero, in forma logaritmica ed ammettendo che $R = m_{soil}/V_0$ e $A_{eq}\,\%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{A_{eq}\%/100}{1 - A_{eq}\%/100}\right] \qquad (2)$$

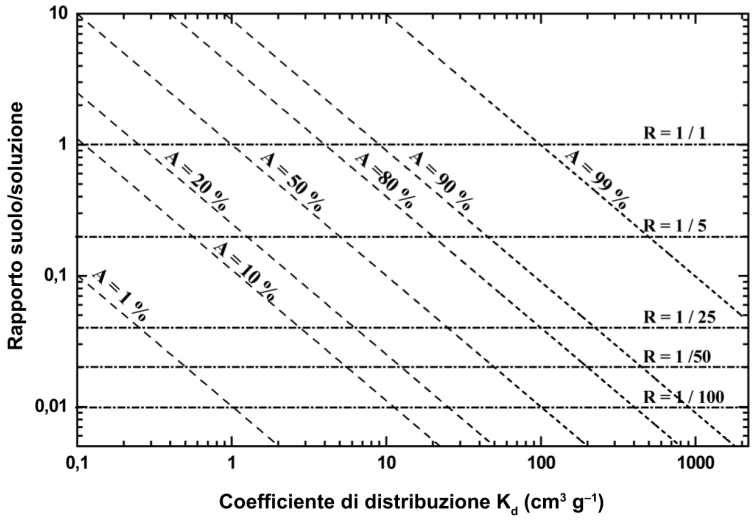


Fig. 1. Relazioni fra i valori di K_d e i vari rapporti terreno/soluzione, alle varie percentuali della sostanza sotto esame adsorbita

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$

▼B

La figura 1 mostra i rapporti terreno/soluzione, espressi in funzione di K_d, per i vari livelli di adsorbimento. Ad esempio: per un rapporto terreno/soluzione di 1 a 5 e $K_d = 20$, l'adsorbimento dovrebbe essere dell'80 % circa. A parità di K_d, per ottenere un adsorbimento del 50 % andrebbe impiegato un rapporto di 1 a 25. Questa maniera di scegliere gli adeguati rapporti terreno/soluzione offre al ricercatore la flessibilità necessaria per rispondere alle esigenze sperimentali.

Le maggiori difficoltà s'incontrano quando la sostanza chimica viene adsorbita in misura molto elevata o molto bassa. Quando l'adsorbimento è basso, è raccomandabile adottare un rapporto terreno/soluzione di 1 a 1, anche se, per alcuni tipi di terreno ad elevato contenuto organico, può essere necessario ricorrere a rapporti più bassi, in modo da ottenere un impasto liquido. La metodologia analitica dovrà permettere di misurare piccole modifiche della concentrazione della soluzione; in caso contrario, le misure di adsorbimento saranno imprecise. D'altra parte, per valori molto elevati di K_d si può arrivare a rapporti terreno/soluzione di 1 a 100, per lasciare in soluzione una quantità significativa della sostanza chimica. Si avrà comunque cura di assicurare una buona miscelazione, e si lascerà al sistema un tempo adeguato per raggiungere l'equilibrio. Un'altra possibilità è quella di prevedere il valore di Kd applicando tecniche di valutazione fondate, ad esempio, sui valori di P_{ow} (appendice 3). Ciò potrebbe rivelarsi utile, specialmente nel caso delle sostanze chimiche scarsamente adsorbite/polari, con $P_{ow} < 20$, e di quelle lipofile/altamente sorbitive, con $P_{ow} > 10^4$.

1.9. ESECUZIONE DELL'ESPERIMENTO

1.9.1. **Condizioni sperimentali**

Tutta la sperimentazione deve essere effettuata a temperatura ambiente, possibilmente costante, compresa fra 20 °C e 25 °C.

Le condizioni di centrifugazione debbono permettere di eliminare dalla soluzione le particelle oltre 0,2 μm. Questo valore rappresenta le dimensioni limite fra le particelle solide e quelle colloidali. L'appendice 4 offre una guida per determinare le condizioni di centrifugazione.

Se l'apparecchiatura di centrifugazione disponibile non garantisce l'eliminazione delle particelle sopra gli 0,2 μm, la centrifugazione può essere associata alla filtrazione attraverso filtri da 0,2 μm. Per evitare perdite della sostanza sotto esame, questi debbono essere composti di un appropriato materiale inerte. Va in ogni caso assicurato che durante la filtrazione non si verifichino perdite della sostanza sotto esame.

1.9.2. **Primo momento: studio preliminare**

Le ragioni di uno studio preliminare sono già state indicate al capitolo «Campo di applicazione». Lo schema sperimentale suggerito qui appresso costituisce una guida per la sua esecuzione.

1.9.2.1. *Scelta dei rapporti ottimali terreno/soluzione*

Si ricorre a due tipi di terreno e a tre rapporti terreno/soluzione (sei esperimenti). Un tipo di terreno ha un elevato contenuto in carbonio organico e un basso contenuto in argilla, e l'altro ha un basso contenuto in carbonio organico e un elevato contenuto in argilla. Si suggeriscono i seguenti rapporti:

— 50 g di terreno e 50 cm^3 di soluzione acquosa della sostanza sotto esame (rapporto 1/1),

▼B

— 10 g di terreno e 50 cm^3 di soluzione acquosa della sostanza sotto esame (rapporto 1/5),

— 2 g di terreno e 50 cm^3 di soluzione acquosa della sostanza sotto esame (rapporto 1/25).

La quantità minima di terreno da impiegare dipende dalle disponibilità del laboratorio e dall'efficacia del metodo analitico applicato. Per ottenere risultati attendibili si raccomanda comunque di impiegare non meno di 1 g, e preferibilmente 2 g.

Per verificare se la sostanza sotto esame è stabile nella soluzione di $CaCl_2$ e se eventualmente rimane adsorbita sulle pareti dei recipienti, si preparerà un campione di riferimento non contenente terreno, ma soltanto la sostanza in questione e la soluzione di $CaCl_2$0,01 M: esso verrà sottoposto esattamente alle stesse operazioni dei sistemi esaminati.

Per ogni terreno si preparerà un «bianco» contenente la stessa quantità di terreno e un volume totale di 50 cm^3 di soluzione di $CaCl_2$0,01 M (senza la sostanza sotto esame), che verrà sottoposto alla stessa procedura sperimentale. Esso servirà da riferimento di base durante l'analisi, per rivelare se sono presenti sostanze capaci di interferire o se il terreno è contaminato.

Tutti gli esperimenti, compresi quelli sul campione di riferimento e sui «bianchi», verranno effettuati almeno in doppio. Il numero totale di campioni da preparare per lo studio va stabilito in funzione della metodologia da seguire.

I metodi per lo studio preliminare e per quello principale sono genericamente gli stessi: se del caso, gli eventuali discostamenti vanno menzionati.

I campioni di terreno essiccati all'aria vengono equilibrati mantenendoli sotto agitazione per 12 h (tutta la notte precedente l'esperimento) insieme a un volume minimo di 45 cm^3 di $CaCl_2$0,01 M. Si aggiunge poi un certo volume della soluzione di riserva della sostanza sotto esame, fino a un totale di 50 cm^3. Il volume di soluzione di riserva aggiunto: a) non deve eccedere il 10 % dei 50 cm^3 di volume della fase acquosa, per alterare il meno possibile la natura della soluzione di pre-equilibrazione; b) deve condurre di preferenza a una concentrazione iniziale della sostanza sotto esame a contatto col terreno (Co) superiore di almeno due ordini di grandezza al limite di rivelazione del metodo analitico, per salvaguardare la capacità di eseguire misure esatte anche quando l'adsorbimento è forte (> 90 %) e determinare più tardi le isoterme di adsorbimento. Si raccomanda inoltre, se possibile, che la concentrazione iniziale (Co) della sostanza sotto esame non superi la metà del suo limite di solubilità.

Il seguente esempio indica il modo di calcolare la concentrazione della soluzione di riserva (Cst). Si parte dall'idea che il limite di rivelazione sia di 0,01 μg cm^{-3} e l'adsorbimento sia del 90 %: la concentrazione iniziale della sostanza sotto esame a contatto col suolo dovrebbe quindi essere preferibilmente uguale ad 1 μg cm^{-3} (due ordini di grandezza sopra il limite di rivelazione). Ammettendo che si sia aggiunto il massimo volume raccomandato della soluzione di riserva, cioè da 5 a 45 cm^3 della soluzione di equilibrazione di $CaCl_2$0,01 M (= 10 % della soluzione di riserva rispetto a 50 cm^3 di volume totale della fase acquosa), la concentrazione della soluzione di riserva dovrebbe essere di 10 μg cm^{-3}, cioè superiore di tre ordini di grandezza al limite di rivelazione del metodo analitico.

Il pH della fase acquosa deve essere misurato prima e dopo il contatto col terreno, poiché esso ha una funzione importante nell'intero processo di adsorbimento, specialmente per le sostanze ionizzabili.

▼B

La miscela deve essere agitata finché sia raggiunto l'equilibrio di adsorbimento. Il tempo di equilibrio nei terreni è assai variabile, secondo la natura del prodotto chimico e del terreno: in generale è sufficiente un periodo di 24 h (77). Nello studio preliminare, i campioni possono essere prelevati sequenzialmente su un periodo di 48 h di miscelazione (ad esempio 4. 8, 24, 48 h). Comunque, i tempi di analisi debbono essere considerati con flessibilità, tenendo conto dei programmi di lavoro del laboratorio.

Per l'analisi della sostanza sotto esame nella soluzione acquosa è possibile scegliere fra: a) il metodo in parallelo: b) il metodo in serie. Si noti che, sebbene il metodo in parallelo sia più tedioso sul piano sperimentale, il trattamento matematico dei risultati ne risulta semplificato (appendice 5). La scelta della metodologia da seguire spetta comunque allo sperimentatore, il quale terrà conto delle disponibilità materiali e delle risorse del laboratorio.

a) Metodo in parallelo: si preparano dei campioni con lo stesso rapporto terreno/soluzione, nel numero necessario per coprire gli intervalli di tempo ai quali si desidera studiare la cinetica di adsorbimento. Dopo centrifugazione e facoltativa filtrazione, la fase acquosa della prima provetta viene recuperata nel modo più completo possibile; si procede quindi alle misure dopo tempi adeguati (ad esempio dopo 4 h per la prima provetta, dopo 8 h per la seconda, dopo 24 h per la terza, ecc.).

b) Metodo in serie: per ciascun rapporto terreno/soluzione si prepara soltanto un campione in doppio. A determinati intervalli di tempo, la miscela viene centrifugata per separare le fasi. In una piccola aliquota della fase acquosa si ricerca immediatamente la sostanza sotto esame; dopo di che, l'esperimento prosegue sulla miscela originale. Se la centrifugazione è stata seguita dalla filtrazione, il laboratorio deve avere la possibilità di eseguire la filtrazione di piccole aliquote acquose. Per non modificare in modo significativo il rapporto terreno/soluzione e far diminuire la massa del soluto disponibile per l'adsorbimento durante la prova, si raccomanda che il volume totale delle aliquote prelevate non superi l'1 % del volume totale della soluzione.

Per ciascun tempo t_i si calcola la percentuale di adsorbimento A_{t_i}, sulla base della concentrazione nominale iniziale e della concentrazione misurata ai momenti t_i del prelievo, previa correzione per il bianco. Per valutare se la piattaforma di equilibrio è stata raggiunta, si riportano graficamente i valori di A_{t_i} in funzione del tempo (cfr. appendice 5, fig. 1) ([1]). Si calcola inoltre il valore di K_d all'equilibrio. Sulla base del valore di K_d ed utilizzando la fig.l si scelgono gli appropriati rapporti terreno/soluzione, in modo che l'adsorbimento percentuale risulti superiore al 20 % e, di preferenza, al 50 % (61). Tutte le equazioni applicabili e i principi per il tracciamento del grafico sono indicati al capitolo sulla presentazione dei dati e la relazione, nonché nell'appendice 5.

1.9.2.2. *Determinazione del tempo di equilibrazione all'adsorbimento e della quantità di sostanza sotto esame adsorbita all'equilibrio*

Come già detto, i grafici di A_{t_i} o di C_{aq}^{ads} in funzione del tempo permettono di stabilire se l'equilibrio all'adsorbimento è stato raggiunto e di valutare la quantità di sostanza sotto esame adsorbita all'equilibrio. Le figure 1 e 2 nell'appendice 5 mostrano alcuni esempi di tali grafici. Il tempo di equilibrio è quello necessario perché il sistema raggiunga una piattaforma.

([1]) Per valutare se la piattaforma di equilibro è stala raggiunta si potrebbero impiegare arche i grafici della concentrazione della sostanza sotto esame nella fase acquosa (C_{ad}^{saq}) in funzione del tempo (cfr. appendice 5, fig. 2).

▼B

Se con un dato terreno non si raggiunge una piattaforma ma si ha un incremento continuo, la causa andrebbe cercata in certi fattori di complicanza, quali la biodegradazione o la diffusione lenta. La biodegradazione può essere evidenziata ripetendo l'esperimento su un campione di terreno sterilizzato. Se nemmeno in questo modo si raggiunge una piattaforma, lo sperimentatore dovrebbe esaminare l'eventualità che nei suoi specifici studi possano essere coinvolti altri fenomeni, e modificare adeguatamente le condizioni sperimentali (temperatura, tempi di agitazione, rapporti terreno/soluzione). Inoltre, spetta a lui decidere se proseguire il lavoro malgrado l'eventuale impossibilità di raggiungere un equilibrio.

1.9.2.3. *Adsorbimento alla superficie dei recipienti e stabilità della sostanza sotto esame*

Alcuni dati sulla stabilità della sostanza sotto esame e sul suo adsorbimento alla superficie dei recipienti possono essere ricavati analizzando i campioni di riferimento. Se si osserva una deplezione superiore all'errore standard implicito nel metodo analitico, si potrebbe pensare a una degradazione abiotica e/o ad un adsorbimento alla superficie del recipiente. Una distinzione fra questi due fenomeni può essere fatta lavando a fondo le pareti del recipiente con un volume noto di un opportuno solvente ed analizzando il liquido di lavaggio per ricercarvi la sostanza sotto esame. Se non si osserva alcun adsorbimento alla superficie dei recipienti, la deplezione evidenzia l'instabilità abiotica della sostanza sotto esame. Se si constata un adsorbimento, è necessario utilizzare recipienti in altro materiale. In ogni modo, i dati sull'adsorbimento così ottenuti non possono essere estrapolati direttamente all'esperimento terreno/soluzione, poiché la presenza del terreno influisce sull'adsorbimento.

Ulteriori informazioni sulla stabilità della sostanza sotto esame possono essere ricavate da un bilancio della massa progenitrice nel tempo. In altre parole, bisogna analizzare la fase acquosa, gli estratti del terreno e le pareti dei recipienti per ricercarvi la sostanza sotto esame. La differenza fra la massa della sostanza sotto esame aggiunta e la somma delle masse della sostanza sotto esame nella fase acquosa, negli estratti di terreno e nelle pareti dei recipienti corrisponde alla massa degradata c/o volatilizzata e/o non estratta. Per un corretto bilancio di massa, l'equilibrio di adsorbimento dovrebbe essere stato raggiunto durante l'esperimento.

Il bilancio di massa dev'essere eseguito tanto sui terreni quanto per un rapporto terreno/soluzione per ogni terreno che all'equilibrio dia luogo a una deplezione superiore al 20 % e preferibilmente al 50 %. Quando l'esperimento per la ricerca dei rapporti viene completato con l'analisi dell'ultimo campione della fase acquosa dopo 48 h, le fasi debbono essere separate per centrifugazione e facoltativa filtrazione. La fase acquosa dev'esere recuperata nella maggior quantità possibile, aggiungendo poi al terreno un solvente di estrazione adatto (coefficiente di estrazione non inferiore al 95 %) per estrarne la sostanza sotto esame. Si raccomanda di eseguire non meno di due estrazioni successive. Si determina poi la quantità di sostanza sotto esame negli estratti del terreno e dei recipienti e si calcola il bilancio di massa (equazione 10, «Dati e relazione»). Se essa è inferiore al 9 %, la sostanza sotto esame viene considerata instabile nella scala di tempo dell'esperimento. Gli studi vanno comunque proseguiti, tenendo conto dell'instabilità della sostanza sotto esame: in questo caso si raccomanda di esaminare ambedue le fasi nello studio principale.

▼B

1.9.2.4. *Secondo momento — Cinetica di adsorbimento per una data concentrazione della sostanza sotto esame*

Si impiegano cinque terreni, scelti dalla tabella 1. Può convenire includere fra di essi qualcuno di quelli impiegati nello studio preliminare (al limite, tutti}. In questo caso, le operazioni del secondo momento non vanno ripetute sui terreni impiegati nello studio preliminare.

Il tempo di equilibrio, il rapporto terreno/soluzione, il peso di campione di terreno, il volume della fase acquosa a contatto col terreno e la concentrazione della sostanza sotto esame nella soluzione debbono essere scelti sulla base dei risultati degli studi preliminari. Di preferenza, l'analisi deve essere eseguita dopo circa 2, 4, 6, 8 e possibilmente anche 10 e 24 ore di contatto; il tempo di agitazione può essere portato fino a un massimo di 48 h nel caso che una sostanza chimica richieda tempi di equilibrio più lunghi rispetto ai risultati della ricerca del campo di rapporti. In ogni modo, i tempi di analisi debbono essere considerati con flessibilità.

Ogni esperimento (un terreno ed una soluzione) deve essere fatto almeno in doppio, per poter valutare la varianza dei risultati. Per ogni esperimento va previsto un bianco, consistente nel terreno e nella soluzione di $CaCl_2$0,01 M, senza aggiunta della sostanza sotto esame, di peso e volume rispettivamente identici a quelli dell'esperimento. A titolo di salvaguardia contro gli imprevisti, si sottoporrà alla stessa procedura sperimentale un campione di controllo contenente soltanto la sostanza sotto esame nella soluzione di $CaCl_2$0,01 M (senza aggiunta di terreno).

L'adsorbimento percentuale va calcolato per ogni attimo A_{t_i} e/o intervallo di tempo $A_{\Delta t_i}$ (secondo necessità), e riportato in funzione del tempo. Vanno altresì calcolati il coefficiente di distribuzione K_d all'equilibrio e il coefficiente di adsorbimento normalizzato per il carbonio organico K_{oc} (per i composti chimici organici non polari).

Risultati degli esperimenti sulla cinetica di adsorbimento

Il valore lineare K_d è generalmente abbastanza preciso da poter descrivere il comportamento relativo al sorbimento nei terreni (35) (78) e rappresenta un'espressione della mobilità intrinseca dei prodotti chimici nel terreno. Ad esempio: sul piano generale, i prodotti chimici con $K_d < 1\ cm^3\ g^{-1}$ sono considerati qualitativamente mobili. McCall et al. hanno inoltre messo a punto uno schema di classifica della mobilità basato sul valore di K_{oc} (16). Esistono infine schemi di classifica in funzione del dilavamento, basati su una relazione fra K_{oc} e DT-50 ([1]) (32) (79).

Da studi sull'analisi degli errori (61) risulta altresì che, partendo da una diminuzione della concentrazione della fase acquosa, non è possibile valutare con precisione i valori di K_d inferiori a $0{,}3\ cm^3\ g^{-1}$, neppure quando si applica il rapporto terreno/soluzione più favorevole dal punto di vista della precisione, cioè quello di 1:1. In questo caso si raccomanda di analizzare ambedue le fasi (terreno e soluzione).

([1]) DT-50: tempo di degradazione per il 50 % della sostanza sotto esame.

▼B

Quanto alle osservazioni di cui sopra, si raccomanda di proseguire gli studi del comportamento all'adsorbimento di un prodotto chimico nel terreno e della sua mobilità potenziale, determinando le isoterme di adsorbimento secondo Freundlich, per tutti i sistemi per i quali il valore di K_d può essere determinato con esattezza, applicando il protocollo sperimentale descritto nel presente metodo. Una determinazione accurata è possibile se il valore ottenuto moltiplicando K_d per il rapporto terreno/soluzione è superiore a 0,3, quando le misure si basano sulla diminuzione di concentrazione nella fase acquosa (metodo indiretto), oppure a 0,1, quando vengono analizzate ambedue le fasi (metodo diretto) (61).

1.9.2.5 *Terzo momento — Isoterme di adsorbimento e cinetica di desorbimento/isoterme di desorbimento*

1.9.2.5.1. Isoterme di adsorbimento

Si impiegano cinque concentrazioni della sostanza sotto esame, tali da coprire preferibilmente due ordini di grandezza: per la scelta di queste concentrazioni vanno prese in conto la solubilità in acqua e le concentrazioni all'equilibrio acquoso che ne risultano. Lo stesso rapporto terreno/soluzione per ogni terreno deve essere mantenuto per tutta la durata dello studio. La prova di adsorbimento viene eseguita come sopra descritto, con la sola differenza che la fase acquosa viene analizzata una sola volta, al momento necessario per raggiungere l'equilibrio. come determinato al secondo momento. Si determinano le concentrazioni all'equilibrio nella soluzione e si calcola la quantità adsorbita partendo dalla deplezione della sostanza sotto esame nella soluzione, oppure col metodo diretto. La massa adsorbita, riferita all'unità di massa di terreno, viene poi riportata graficamente, in funzione della concentrazione all'equilibrio della sostanza sotto esame (cfr. «Dati e relazione»).

Risultati della sperimentazione per le isoterme di adsorbimento

Fra i modelli matematici per l'adsorbimento proposti fino ad oggi, le isoterme di Freundlich sono quelle più frequentemente utilizzate per descrivere i procedimenti di adsorbimento. Dati più particolareggiati sull'interpretazione e l'importanza dei modelli di adsorbimento sono reperibili in letteratura (41) (45) (80) (81) (82).

NB: va tenuto presente che, per varie sostanze, un confronto fra i valori di K_F (coefficienti di adsorbimento secondo Freundlich) è possibile soltanto se tali valori sono espressi nelle stesse unità (83).

1.9.2.5.2. Cinetica di desorbimento

Questo esperimento ha lo scopo di stabilire se una sostanza chimica viene adsorbita reversibilmente o irreversibilmente dal terreno. Questo dato è importante, poiché i processi di desorbimento hanno anch'essi una funzione rilevante nel comportamento di un composto chimico nelle condizioni effettive sul terreno. Inoltre, i dati di desorbimento contribuiscono utilmente alla modellizzazione computerizzata del dilavamento ed alla simulazione della scomparsa della sostanza dilavata. Se si vuole studiare il desorbimento, si raccomanda di eseguire lo studio appresso descritto su ciascun sistema per il quale è stato possibile determinare con accuratezza il valore di K_d nel precedente studio sulla cinetica di adsorbimento.

Analogamente alla cinetica di adsorbimento, per studiare la cinetica di desorbimento esistono due possibilità: a) il metodo in parallelo; b) il metodo in serie. La scelta della metodologia da seguire è lasciata allo sperimentatore, che dovrà considerare le disponibilità strumentali e le risorse del laboratorio.

▼B

a) Metodo in parallelo: per ciascun terreno scelto per lo studio sul desorbimento si preparano dei campioni con lo stesso rapporto terreno/soluzione, nel numero necessario per coprire gli intervalli di tempo ai quali si desidera studiare la cinetica di desorbimento. Di preferenza, vanno impiegati gli stessi intervalli di tempo utilizzati per la cinetica di adsorbimento; tuttavia, il tempo totale può essere esteso secondo necessità, in modo che il sistema possa raggiungere l'equilibrio di desorbimento. Per ogni esperimento (un terreno, una soluzione) si esegue un bianco. Esso consiste nel terreno e nella soluzione 0,01 M di $CaCl_2$, senza la sostanza sotto esame, nonché di un peso e un volume rispettivamente identici a quelli dell'esperimento. Quale termine di riferimento s'impiega la sostanza sotto esame nella soluzione 0,01 M di CaCl, (senza terreno), che viene sottoposta alla stessa procedura sperimentale. Tutte le miscele del terreno con la soluzione vengono agitate fino a raggiungimento dell'equilibrio di adsorbimento (come in precedenza al secondo momento). Le due fasi vengono quindi separate per centrifugazione, e la fase acquosa viene allontanata nella maggior misura possibile. Il volume della soluzione allontanata viene sostituito da un volume uguale di 0,01 M $CaCl_2$, senza la sostanza sotto esame, e le nuove miscele vengono nuovamente agitate. La fase acquosa della prima provetta viene recuperata nel modo più completo possibile e viene misurata, ad esempio, dopo 2 h, quella della seconda provetta dopo 4 h, quella della terza dopo 6 h, ecc. finché sia raggiunto l'equilibrio di desorbimento.

b) Metodo in serie: dopo l'esperimento sulla cinetica di adsorbimento, la miscela viene centrifugata e la fase acquosa viene eliminata nella maggior misura possibile. Il volume di soluzione eliminato viene sostituito da un uguale volume di $CaCl_2$0,01 M, senza la sostanza sotto esame. La nuova miscela viene agitata fino a raggiungere l'equilibrio di desorbimento. Durante questo periodo di tempo, ad intervalli di tempo definiti, la miscela viene centrifugata per separare le fasi. La sostanza sotto esame viene ricercata immediatamente in una piccola aliquota della fase acquosa; l'esperimento prosegue quindi con la miscela originale. Il volume delle singole aliquote deve essere inferiore all'1 % del volume totale. Si aggiunge alla miscela la stessa quantità di soluzione fresca di $CaCl_2$0,01 M, in modo da mantenere il rapporto terreno/soluzione e si prosegue l'agitazione fino al successivo intervallo di tempo.

Il desorbimento percentuale viene calcolato ad ogni momento (D_{t_i})e/o intervallo tempo ($D_{\Delta t_i}$), secondo le esigenze dello studio, e riportato graficamente in funzione del tempo. Si calcola anche il coefficiente di desorbimento Kd_{es} all'equilibrio. Tutte le equazioni applicabili sono riportate al capitolo «Presentazione dei dati e relazione», nonché nell'appendice 5.

Risultati dell'esperimento sulla cinetica di desorbimento

I grafici comuni del desorbimento percentuale D_{t_i} e dell'adsorbimento percentuale A_{t_i} in funzione del tempo permettono di valutare la reversibilità dei processi di adsorbimento. Se l'equilibrio di desorbimento viene raggiunto entro un tempo che può essere anche doppio del tempo ottenuto per l'equilibrio di adsorbimento, e il desorbimento totale risulta superiore al 75 % della quantità adsorbita, l'adsorbimento è considerato reversibile.

1.9.2.5.3. Isoterme di desorbimento

Le isoterme di desorbimento secondo Freundlich sono determinate sui terreni impiegati nell'esperimento sulle isoterme di adsorbimento. La prova di desorbimento viene eseguita come descritto al capitolo «Cinetica di desorbimento» con la sola differenza che la fase acquosa viene analizzata soltanto una volta, all'equilibrio di desorbimento. Si procede poi al calcolo della quantità di sostanza sotto esame desorbita. La quantità di sostanza sotto esame che resta adsorbita sul terreno all'equilibrio di desorbimento viene riportata graficamente in funzione delle concentrazioni di equilibrio della sostanza sotto esame in soluzione (cfr. «Presentazione dei dati e relazione» ed appendice 5).

▼B

2. **PRESENTAZIONE DEI DATI E RELAZIONE**

I dati analitici vanno presentati in forma tabulare (cfr. appendice 6). Vanno indicate le misure singole e le medie calcolate. Debbono essere fornite le rappresentazioni grafiche delle isoterme di adsorbimento. I calcoli vanno eseguiti come appresso indicato.

Ai fini della prova, il peso di 1 cm^3 di soluzione acquosa è considerato uguale a 1 g. Il rapporto terreno/soluzione può essere espresso in unità peso/peso o peso/volume con la stessa cifra.

2.1. ADSORBIMENTO

L'adsorbimento (A_{t_i}) si definisce come percentuale della sostanza sotto esame adsorbita dal terreno, riferita alla quantità presente all'inizio della prova, nelle condizioni sperimentali. Se la sostanza sotto prova è stabile e non viene adsorbita significativamente sulle pareti del recipiente, A_{t_i} può essere calcolato a ciascun momento t_i, con l'equazione:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0}(\%) \qquad (3)$$

dove:

A_{ti} = percentuale di adsorbimento al momento t_i (%);

$m_s^{ads}(t_i)$ = massa della sostanza sotto esame adsorbita sul terreno al momento t_i (μg);

m_0 = massa della sostanza sotto esame nella provetta, all'inizio della prova (μg).

Informazioni particolareggiate sul modo di calcolare la percentuale di adsorbimento A_{t_i} per i metodi in serie e in parallelo sono fornite nell'appendice 5.

Il coefficiente di distribuzione K_d è il rapporto fra il contenuto della sostanza nella fase terreno e la concentrazione di massa della sostanza della soluzione acquosa, nelle condizioni sperimentali, al momento in cui viene raggiunto l'equilibrio di adsorbimento.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \qquad (4)$$

dove:

$C_s^{ads}(eq)$ = contenuto della sostanza adsorbita sul terreno all'equilibrio di adsorbimento (ug g^{-1});

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = concentrazione di massa della sostanza nella fase acquosa all'equilibrio di adsorbimento (μg cm^{-3}). Questa concentrazione viene determinata analiticamente tenendo conto dei valori indicati dai bianchi;

$m_s^{ads}(eq)$ = massa della sostanza adsorbita sul terreno all'equilibrio di adsorbimento (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa della sostanza in soluzione all'equilibrio di adsorbimento (μg);

m_{soil} = quantità della fase terreno, espressa come massa secca di terreno (g);

V_0 = volume iniziale della fase acquosa a contatto col terreno (cm^3).

La relazione fra A_{eq} e K_d è data dall'espressione:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

dove:

A_{eq} = percentuale di adsorbimento all'equilibrio di adsorbimento, %.

Il coefficiente normalizzato di adsorbimento del carbonio organico K_{oc} collega il coefficiente di distribuzione K_d al contenuto di carbonio organico del campione di terreno:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} (cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

dove:

% OC = percentuale di carbonio organico nel campione di terreno (g g^{-1}).

Il coefficiente K_{oc} rappresenta un valore singolo che caratterizza la ripartizione, principalmente delle sostanze chimiche organiche non polari, fra il carbonio organico contenuto nel terreno o nel sedimento e l'acqua. L'adsorbimento di queste sostanze chimiche è in relazione col contenuto organico del solido sorbente (7); quindi, i valori di K_{oc} dipendono dalle specifiche caratteristiche delle frazioni umiche che differiscono considerevolmente per la loro capacità di sorbimento a causa delle differenze di genesi, di provenienza ecc.

2.1.1. **Isoterme di adsorbimento**

L'equazione delle isoterme di adsorbimento secondo Freundlich collega la quantità della sostanza sotto esame adsorbita con la concentrazione della sostanza sotto esame in soluzione all'equilibrio (equazione 8).

I dati sono trattati come descritto alla voce «Adsorbimento», e per ciascuna provetta si calcola il contenuto della sostanza sotto esame adsorbita sul terreno dopo la prova di adsorbimento [$C_s^{ads}(eq)$ (eq), altrove indicato come x/m]. Si parte dall'idea che l'equilibrio sia stato raggiunto e che $C_s^{ads}(eq)$ (eq) rappresenti il valore all'equilibrio:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right].V_0}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

L'equazione di adsorbimento secondo Freundlich è data dall'espressione:

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads}.C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

oppure, in forma lineare, da:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

dove:

K_F^{ads} = coefficiente di adsorbimento secondo Freundlich. Le sue dimensioni sono $cm^3\ g^{-1}$ soltanto se 1/n = 1: in tutti gli altri casi, nelle dimensioni di K_F^{ads} [$\mu g^{1-1/n}\ (cm^3)^{1/n}\ g^{-1}$) è introdotto il coefficiente angolare 1/n;

n = costante di regressione; 1/n è generalmente compreso fra 0,7 e 1,0. Ciò sta a indicare che spesso i dati relativi al sorbimento si discostano leggermente dalla linearità.

Si tracciano i grafici delle equazioni (8) e (9), e si calcolano i valori di K_F^{ads} e di 1/n attraverso l'analisi di regressione applicando la (9). Si calcola inoltre il coefficiente di correlazione r^2 dell'equazione logaritmica. Un esempio dei due grafici è presentato nella figura 2.

▼B

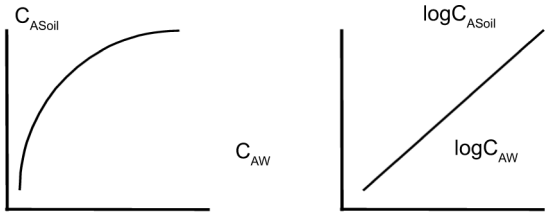


Fig. 2. Grafici di adsorbimento secondo Freundlich, normali e linearizzati

2.1.2. **Bilancio di massa**

Come bilancio di massa (MB) si definisce la percentuale di sostanza che può essere recuperata analiticamente dopo una prova di adsorbimento, espressa in funzione della quantità nominale di sostanza all'inizio della prova.

Il trattamento dei dati sarà diverso se il solvente è completamente miscibile con l'acqua. Nel caso del solvente miscibile con l'acqua, per determinare la quantità di sostanza recuperata per estrazione del solvente si potranno trattare i dati al modo descritto sotto la voce «Desorbimento». Se il solvente è meno miscibile con acqua, si dovrà procedere alla determinazione della quantità recuperata.

Il bilancio di massa MB per l'adsorbimento viene calcolato come appresso indicato: si ammette che il termine (m_E) corrisponda alla somma delle masse dei prodotti chimici sotto prova estratte dal terreno o dalla superficie del recipiente con un solvente organico:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0}(\%) \qquad (10)$$

dove:

MB = bilancio di massa (%)

m_E = massa totale della sostanza sotto prova, estratta dal terreno e dalle pareti del recipiente in due stadi (µg)

C_0 = concentrazione iniziale di massa della soluzione sotto prova a contatto col terreno (µg/cm^3)

V_{rec} = volume del surnatante recuperato dopo l'equilibrio di adsorbimento (cm^{-3}).

2.2. DESORBIMENTO

Il desorbimento (D) si definisce come percentuale della sostanza sotto esame che viene desorbita, riferita alla quantità di sostanza precedentemente adsorbita, nelle condizioni sperimentali:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

dove:

D_{ti} = percentuale di desorbimento al momento t_i (%)

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = massa della sostanza sotto esame desorbita dal terreno al momento t_i (μg)

$m_s^{ads}(eq)$ = massa della sostanza sotto esame adsorbita sul terreno all'equilibrio di adsorbimento (μg).

Informazioni particolareggiate sul modo di calcolare la percentuale di desorbimento D_{t_i} per i metodi in parallelo e in serie figurano nell'appendice 5.

Il coefficiente apparente di desorbimento (K_{des}), nelle condizioni sperimentali, è il rapporto fra il contenuto della sostanza che rimane nella fase terreno e la concentrazione di massa della sostanza desorbita nella soluzione acquosa, al momento in cui l'equilibrio di desorbimento è raggiunto:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (12)$$

dove:

K_{des} = coefficiente di desorbimento $cm^3\ g^{-1}$)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = massa totale della sostanza sotto esame desorbita dal terreno all'equilibrio di desorbimento (μg)

V_T = volume totale della fase acquosa a contatto col terreno durante la prova di cinetica del desorbimento (cm^3).

Una guida per calcolare il $m_{aq}^{des}(eq)$ (eq) figura nell'appendice 5 sotto l'intestazione «Desorbimento».

Osservazioni:

Se la precedente prova di adsorbimento era stata eseguita col metodo in parallelo, il volume V_T nell'equazione 12 viene considerato uguale a V_0.

2.2.1. **Isoterme di desorbimento**

L'equazione delle isoterme di desorbimento secondo Freundlich collega il contenuto della sostanza sotto esame che rimane adsorbita al terreno alla concentrazione della sostanza sotto esame nella soluzione, all'equilibrio di desorbimento (equazione 16).

Per ogni provetta, il contenuto della sostanza che rimane adsorbita al terreno all'equilibrio di desorbimento viene calcolata come segue:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ si definisce come:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^{A}(\mu g) \quad (14)$$

dove:

$C_s^{des}(eq)$ = contenuto della sostanza sotto esame che rimane adsorbito sul terreno all'equilibrio di desorbimento (μg g^{-1})

$m_m^{des}(eq)$ = massa di sostanza determinata analiticamente nella fase acquosa all'equilibrio di desorbimento (μg)

▼B

m_{aq}^{A} = massa della sostanza sotto esame residuata dall'equilibrio di adsorbimento a causa dell'incompleta sostituzione del volume (μg)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = massa della sostanza della soluzione all'equilibrio di adsorbimento (μg)

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = volume della soluzione prelevata dalla provetta per la misura della sostanza sotto esame, all'equilibrio di desorbimento (cm^3)

V_R = volume del surnatante allontanato dalla provetta dopo il raggiungimento dell'equilibrio all'adsorbimento e sostituito dallo stesso volume di soluzione 0,01 M $CaCl_2$ (cm^3).

L'equazione di desorbimento secondo Freundlich è data dalla (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

oppure, in forma lineare:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F{}^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}{}^{des}(eq) \quad (17)$$

dove:

K_F^{des} = coefficiente di desorbimento secondo Freundlich

n = costante di regressione

$C_{aq}^{des}(eq)$ = concentrazione di massa della sostanza nella fase acquosa all'equilibrio di desorbimento (μg cm^{-3}).

Le equazioni (16) e (17) possono essere rappresentate graficamente, e i valori di $K_F{}^{des}$ e 1/n vengono calcolati per analisi di regressione con l'equazione 17.

Osservazioni:

Se l'esponente l/n di adsorbimento o desorbimento secondo Freundlich è uguale a 1, le costanti di legame di adsorbimento o desorbimento secondo Freundlich (K_F^{ads} e K_F^{des}) saranno rispettivamente uguali alle costanti di equilibrio all'adsorbimento o al desorbimento (K_d e K_{des}), e il grafico di C_s in funzione di C_{aq} sarà lineare. Se gli esponenti sono diversi da 1, i grafici di Q in funzione di C_{aq} non saranno lineari, e le costanti di adsorbimento e desorbimento varieranno con le isoterme.

2.2.2. **Relazione**

La relazione deve comprendere i seguenti dati:

— Identificazione completa dei campioni di terreno utilizzati, comprendenti:

— coordinate geografiche della località (latitudine, longitudine),

— data di prelievo del campione,

▼B

— schema d'impiego (esempio: terreno agrario, foresta, ecc),

— profondità del prelievo,

— contenuto in sabbia/torba/argilla,

— valore del pH (come $CaCl_2$0,01 M),

— contenuto in carbonio organico,

— contenuto in sostanza organica,

— contenuto in azoto,

— rapporto C/N,

— capacità di scambio canonico (mmol/kg),

— tutte le informazioni relative alla raccolta e alla conservazione dei campioni di suolo,

— dove del caso, tutte le informazioni rilevanti ai fini dell'interpretazione dell'adsorbimento/desorbimento della sostanza sotto esame,

— riferimento ai metodi impiegati per la determinazione di ciascun parametro,

— informazioni sulla sostanza sotto esame, come del caso,

— temperatura della sperimentazione,

— condizioni di centrifugazione,

— procedimento analitico impiegato per analizzare la sostanza sotto esame,

— giustificazione per l'impiego di qualsiasi agente solubilizzante per la preparazione della soluzione di riserva della sostanza sotto esame,

— spiegazione delle correzioni apportate ai calcoli, se del caso,

— dati secondo il formulario dell'appendice 6 e presentazioni grafiche,

— tutte le informazioni e osservazioni che possono essere utili per interpretare i risultati delle prove.

3. **RIFERIMENTI**

(1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02045, Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).

(5) US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines. Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 54O/O9-8S-O96. Date: 1/19SS.

▼B

(6) US Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-rate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048 April 1996.

(7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{OC}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

(8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

(9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995); Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

(11) BBA (1990). Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

(12) Calvet R., (1989), «Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils», in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

(13) Calvet R., (1980), «Adsorption-Desorption Phenomena» in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.

(14) Hasset J.J., and Banwart W.L, (1989), «The sorption of nonpolar organics by soils and sediments» in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp. 31-44.

(15) van Genuchten M.Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), «An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media». Soil Sci. Soc. Am. Proc, Vol. 38(1), pp. 29-35.

(16) McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L, and Dishburger H.J., (1981), «Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis», in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

(17) Lambert S.M, Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965), «Movement and sorption of chemicals applied to the soil». Weeds, 13, pp. 185-190.

(18) Rhodes R.C, Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) «Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils». J.Agric.Food Chem., 18, pp. 524-528.

(19) Russell M.H., (1995), «Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil» in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T. R. Roberts and P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

(20) Esser H.O., Hemingway R.J.. Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), «Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides», IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, pp. 901-932.

▼B

(21) Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), «Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils». Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp. 137-157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C.G.L, and Osgerby J.M., (1967), «Persistence of herbicides in soil» 175. J. Sci. Fd Agric, IS, pp. 269-273.

(23) Burkhard N., and Guth J.A., (1981), «Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4.6-bis(alkylamino)-l,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption». Pestic. Sci. 12, pp. 45-52.

(24) Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977), «Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides». Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, pp. 961-971.

(25) Osgerby J.M, (1973), «Process affecting herbicide action in soil». Pestic. Sci., 4. pp. 247-258.

(26) Guth J.A., (1972), «Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden». Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem. Heft 37, pp. 143-154.

(27) Hamaker J.W., (1975). «The interpretation of soil leaching experiments», in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. Freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.

(28) Helling C.S., (1971). «Pesticide mobility in soils». Soil Sci. Soc. Amer. Proc, 35, pp. 732-210.

(29) Hamaker J.W. (1972). «Diffusion and volatilization» in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds), Vol. I. pp. 49-143.

(30) Burkhard N. and Guth J.A.. (1981), «Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system». Pestic. Sci. 12, pp. 37-44.

(31) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), «Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses», in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D.I., (1989), «Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability». J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), pp. 339-357.

(33) Leistra M, and Dekkers W.A., (1976). «Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils». J. of Soil Sci., 28, pp. 340-3 50.

(34) Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), «Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxidation products in fallow soils». Pest. Sci., 11, pp. 389-395.

(35) Green R.E., and Karickoff S.W., (1990), «Sorption estimates for modeling», in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80-101.

(36) Lambert S.M., (1967), «Functional relationship between sorption in soil and chemical structure». J. Agri. Food Chem., 15, pp. 572-576.

▼B

(37) Hance R.J., (1969), «An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils». J. Agri. Food Chem., 17, pp. 667-668.

(38) Briggs G.G. (1969), «Molecular structure of herbicides and their sorption by soils». Nature, 223, 1288.

(39) Briggs G.G. (1981). «Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor».). Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(40) Sabljic A., (1984), «Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology». J. Agric. Food Chem., 32, pp. 243-246.

(41) Bailey G.W., and White J.L, (1970), «Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil». Residue Rev., 32, pp. 29-92.

(42) Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), «Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate». Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32: pp. 222-234.

(43) Karickhoff S.W., (1981), «Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils». Chemosphere 10, pp. 833-846.

(44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), «Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners». Environ. Toxicol. Safety 21, pp. 1-17.

(45) Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972), «Adsorption in organic chemicals» in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C. A. I. and Hamaker J. W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.

(46) Deli J., and Warren G.F., 1971, «Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils». Weed Sci. 19: pp. 67-69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), «Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils». Weed Science, Vol. 23, pp. 454-457.

(48) Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968), «Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations» in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H.B., and Deangelis R.J. (1980), «Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase». CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems. Chapter 19. Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

(50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

(51) Scheffer F. and Schachtschabel. Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag. Stuttgart (1982), 11th edition.

(52) Black, Evans D. D., White J. L.. Ensminger L. E., and Clark F. E., eds. «Methods of Soil Analysis», Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, Wl, 1982.

▼B

(53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R.E., and Yamane V.K., (1970), «Precision in pesticide adsorption measurements». Soil Sci. Am. Proc, 34, pp. 353-354.

(60) Grover R., and Hance R. J. (1970), «Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine». Soil Sci., pp. 109-138.

(61) Boesten, J.J.T.I, «Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system». Pest. Sci. 1990, 30, pp. 31-41.

(62) Boesten, J.J.T.I. «Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106». Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

(63) Bastide J., Cantier J.M., et Coste C, (1980), «Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique». Weed Res. 21, pp. 227-231.

(64) Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), «Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments». J. Environ.Qual., 10(3), pp. 382-386.

(65) Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), «Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water». Environ. Sci. Technol., 17(4), pp. 227-231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), «Sorption of organic substances by soils and sediments». J. Environm. Sci. Health, B19 (3), pp. 297-312.

(67) Vowles P.D., and Mantoura R.F.C, (1987), «Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons». Chemosphere, 16(1), pp. 109-116.

(68) Lyman W.J., Reehl W.F.and Rosenblatt D.H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). «Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota» in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

(70) Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), «A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds». Science, Vol. 206, pp. S31-832.

(71) Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C, (1981), «Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption». Soil Sci. Soc. Am. J. 45, pp. 38-42.

(72) Karickhoff S.W., (1981), «Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils». Chemosphere, Vol. 10(8), pp. 833-S46.

(73) Moreale A., van Bladel R., (1981), «Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité-reactivité». Revue de 1'Agric. 34 (4). pp. 319-322.

(74) Muller M., Kordel W. (1996), «Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil». Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(75) Kordel W., Kotthoff G., Muller M. (1995). «HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — results of a ring test». Chemosphere 30 (7), pp. 1373-1384.

(76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), «HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — comparison of different stationary phases». Chemosphere 27 (12), pp. 2341-2352.

(77) Hance, R.J., (1967), «The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides». Weed Research, Vol. 7, pp. 29-36.

(78) Koskinen W.C, and Harper S.S., (1990), «The retention processes: mechanisms» in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H. H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), «Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses», in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C.H., (1970), «Interpretation and use of sorption isotherms» in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14-32.

(81) Giles, C.H.; McEwan J.H.: Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), «Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils». J. Chem. Soc, pp. 3973-93.

(82) Calvet R., Terce M., and Arvien J.C, (1980), «Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption». Ann. Agron. 31: pp. 239-251.

(83) Bedbur E., (1996), «Anomalies in the Freundlich equation», Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

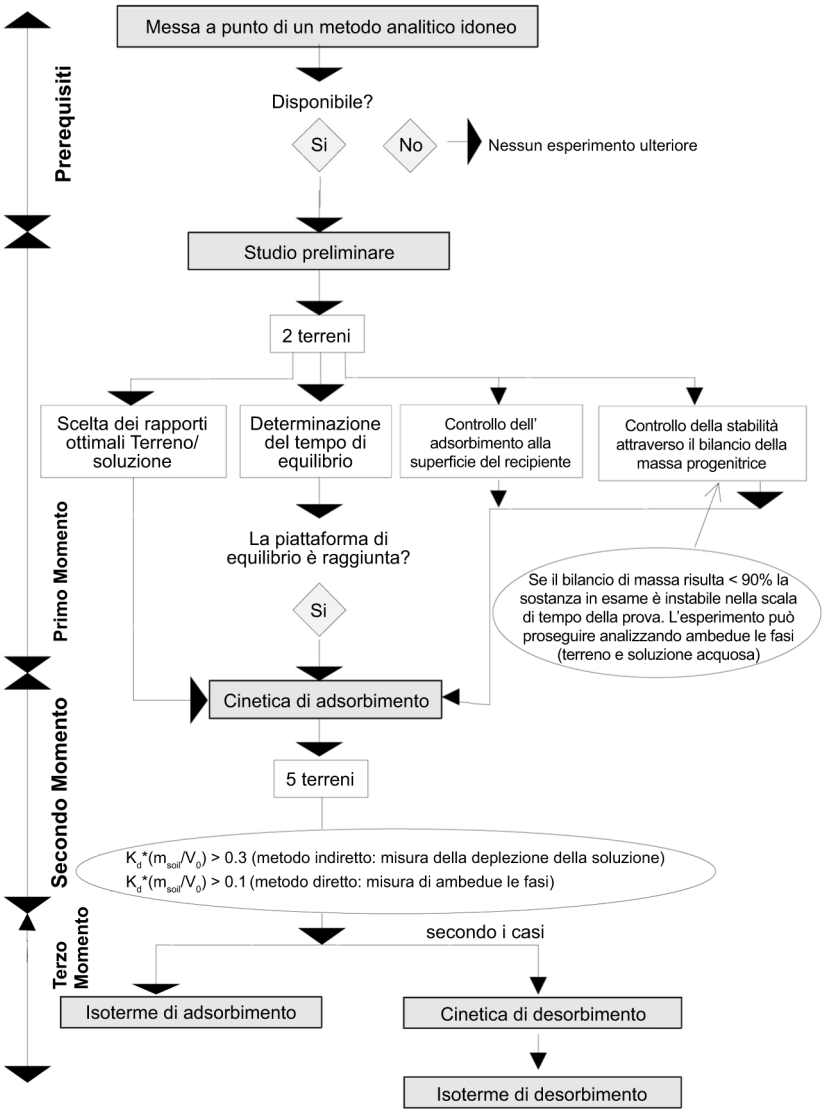
(84) Guth, J. A., (1985), «Adsorption/desorption», in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼B

APPENDICE 1

Schema di sperimentazione



▼B

APPENDICE 2

INFLUENZA DELLA PRECISIONE DEL METODO ANALITICO E DEL CAMBIAMENTO DI CONCENTRAZIONE SULLA PRECISIONE DEI RISULTATI RELATIVI ALL'ADSORBIMENTO

La seguente tabella (84) mostra chiaramente che, quando la differenza fra la massa iniziale (m_0 = 110 µg) e la massa all'equilibrio ($m_{aq}^{ads}(eq)$ = 100 µg) della sostanza sotto esame nella soluzione è assai piccola, un errore del 5 % nella misura della concentrazione all'equilibrio conduce a un errore del 50 % nel calcolo della sostanza adsorbita nel terreno ($m_s^{ads}(eq)$) e del 52,4 % nel calcolo del K_d.

Quantità di terreno m_{soil} = 10 g

Volume di soluzione V_o = 100 cm^3

	$m_{aq}^{ads}(eq)$ (µg)	$C_{aq}{}^{ads}(eq)$ (µg cm^{-3})	R	$m_s^{ads}(eq)$* (µg)	$C_s^{ads}(eq)$* (µg g^{-1})	R‡	K_d*	R‡
	PER A = 9 %							
m_0 = 110 µg or C_0=1,100 µg/cm^3	100	1,000	valore vero	10	1,00	valore vero	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
	PER A = 55 %							
m_0= 110 µg or C_0=1,100 µg/cm^3	50,0	0,500	valore vero	60,0	6,00	valore vero	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
	PER A = 99 %							
m_0 = 110 µg or C_0=1,100 µg/cm^3	1,100	0,011	valore vero	108,9	10,89	valore vero	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

Dove:

$$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq), C_s^{ads}(eq) = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)]V_0}{m_{soil}} \cdot Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}}$$

$m_s^{ads}(eq)$ = massa della sostanza sotto esame nella fase terreno all'equilibrio, µg

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa della sostanza sotto esame nella fase acquosa all'equilibrio, µg

$C_s^{ads}(eq)$ = contenuto della sostanza sotto esame nella fase terreno all'equilibrio, µg g^{-1}

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = concentrazione in massa della sostanza sotto esame nella fase acquosa all'equilibrio, µg cm^{-3}

R = errore analitico nella determinazione di $m_{aq}{}^{ads}(eq)$

R‡ = errore calcolato dovuto all'errore analitico R.

▼B

APPENDICE 3

TECNICHE DI VALUTAZIONE PER K_d

1. Le tecniche di valutazione consentono di prevedere i valori di K_d basandosi, ad esempio, sulle correlazioni con i valori di P_{OW} (12) (39) (63-68), sui dati relativi alla solubilità in acqua (12) (19) (21) (39) (68-73), o su quelli relativi alla polarità ricavati applicando la HPLC in fase invertita (74-76). Come mostrato nelle tabelle 1 e 2, queste equazioni permettono di calcolare i valori di K_{oc} o di K_{om}, dai quali si ricava indirettamente il valore di K_d attraverso le equazioni:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc}(cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1{,}724} \cdot \frac{100}{\%oc}(cm^3 g^{-1})$$

2. Queste correlazioni si fondano essenzialmente su due supposizioni: 1) la principale influenza sull'adsorbimento di una sostanza viene esercitata dalla sostanza organica contenuta nel terreno; 2) le interazioni che si manifestano hanno principalmente un carattere non polare. Di conseguenza, tali correlazioni: 1) non possono essere applicate alle sostanze polari, o possono esserlo soltanto in misura limitata; 2) non possono essere applicate nei casi in cui il contenuto in sostanza organica del terreno è molto basso (12). Inoltre, sebbene si siano trovate correlazioni soddisfacenti fra i valori di P_{OW} e l'adsorbimento (19), lo stesso non può dirsi per le relazioni fra la solubilità in acqua e la misura dell'adsorbimento (19) (21); gli studi effettuati fino ad oggi hanno dato esiti assai contraddittori.

3. Nelle tabelle 1 e 2 sono indicati rispettivamente alcuni esempi di correlazione fra il coefficiente di adsorbimento e il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua, nonché alcuni dati relativi alla solubilità in acqua.

Tabella 1

Esempi di correlazione fra il coefficiente di distribuzione all'adsorbimento e il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua [per ulteriori esempi cfr. (12) (68)]

Sostanza	Correlazioni	Autori
Uree sostituite	$\log K_{om} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Chloroganici aromatici	$\log K_{oc} = - 0{,}779 + 0{,}904 \log P_{ow}$	Chiou et al. (1983) (65)
Antiparassitari diversi	$\log K_{om} = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{ow}$	Gerstl e Mingelgrin (1984) (66)
Idrocarburi aromatici	$\log K_{oc} = - 2{,}53 + 1{,}15 \log P_{ow}$	Vowles e Mantoura (1987) (67)

Tabella 2

Esempi di correlazione fra il coefficiente di distribuzione all'adsorbimento e la solubilità in acqua [per ulteriori esempi cfr. (68) (69)].

Sostanza	Correlazioni	Autori
Antiparassitari diversi	$\log Kom = 3{,}8 - 0{,}561 \log S_w$	Gerstl e Mingelgrin (1984) (66)
Sostanze alifatiche e aromatiche clorurate	$\log K0m = (4{,}040 +/- 0{,}038) - (0{,}557 +/- 0{,}012) \log S_w$	Chiou et al. (1979) (70)
a-naftolo	$\log Koc = 4{,}273 - 0{,}686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Sostanze cicliche, alifatiche e aromatiche	$\log Koc = - 1{,}405 - 0{,}921 \log S_w - 0{,}00953 (mp-25)$	Karickhoff (1981) (72)
Composti vari	$\log Kom = 2{,}75 - 0{,}45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

APPENDICE 4

CALCOLI PER LA DEFINIZIONE DELLE CONDIZIONI DI CENTRIFUGAZIONE

1. Il tempo di centrifugazione è dato dalla formula seguente, basata sul presupposto che le particelle siano sferiche e nella quale,

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln(R_b/R_t) \qquad (1)$$

per semplificare, tutti i parametri sono espressi in unità non appartenenti al SI (g, cm).

dove:

ω = velocità angolare (=2 π rpm/60), rad s^{-1}

rpm = giri al minuto

η = viscosità della soluzione (g s^{-1} cm^{-1})

r_p = raggio delle particelle (cm)

ρ_s = densità del terreno (g cm^{-3})

ρ_{aq} = densità della soluzione (g cm^{-3})

R_t = distanza dal centro del rotore della centrifuga alla sommità della soluzione nella provetta da centrifuga (cm)

R_b = distanza dal centro del rotore della centrifuga al fondo della provetta da centrifuga, cm

R_b-R_t = lunghezza della miscela terreno/soluzione della provetta da centrifuga, cm.

In pratica, per assicurare la separazione completa si usa generalmente raddoppiare i tempi calcolati.

2. L'equazione 1 può essere ulteriormente semplificata ammettendo che la viscosità (η) e la densità (ρ_{aq}) della soluzione siano uguali alla viscosità e alla densità dell'acqua a 25 °C; ne deriva che $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s-1 cm^{-1} e ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3}.

Il tempo di centrifugazione si ricava quindi dall'equazione (2):

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 . r_p{}^2(\rho_s - 1)} \ln\frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. Dall'equazione 2 risulta chiaro che, per stabilire le condizioni di centrifugazione (tempo e velocità) da applicare per ottenere la separazione delle particelle di una data grandezza (nel nostro caso, quelle da 0,1 μm di raggio), i parametri importanti sono due: a) la densità del terreno; b) l'«altezza» (R_b-R_t) della miscela contenuta nella provetta da centrifuga, cioè la distanza che una particella di terreno deve percorrere dalla sommità della soluzione al fondo della provetta. Ovviamente, a parità del volume di contenuto, tale altezza dipenderà dal quadrato del raggio della provetta.

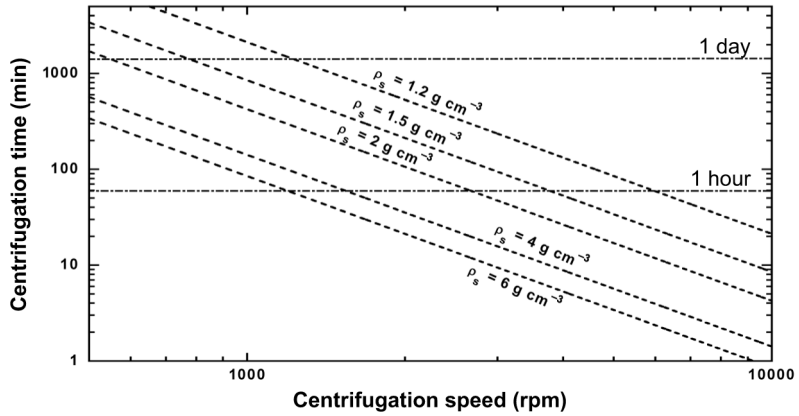
4. Nella figura 1 è rappresentato il modo di variare del tempo di centrifugazione (t) in funzione della velocità di centrifugazione (rpm), secondo le diverse densità del terreno (ρ_s) (Fig. 1a) e secondo la diversa altezza della miscela nelle provette (Fig. 1b). Dalla Fig. 1a risulta ovvia l'influenza della densità del terreno: ad esempio, per una centrifugazione classica a 3000, il tempo di centrifugazione è di 240 min per una densità di 1,2 g cm^3 ma scende a 50 min per una densità di 2,0 g cm^3. Analogamente, dalla Figura 1b si vede che, per una centrifugazione classica a 3000 rpm il tempo di centrifugazione è dell'ordine di 50 min. quando l'altezza della miscela è di 10 cm, ma scende a soli 7 min. per un'altezza di 1 cm. È comunque importante trovare un compromesso ottimale fra le condizioni di centrifugazione, che richiedono la minor altezza possibile, e la facilità di manipolazione da parte dello sperimentatore al momento di separare le fasi dopo la centrifugazione.

▼B

5. Nello stabilire le condizioni sperimentali per la separazione delle fasi terreno/soluzione non va altresì trascurata la possibile esistenza di una terza «pseudofase», costituita dai colloidi. Le particelle colloidali, di diametro inferiore a 0,2 μm, possono avere un effetto importante sull'intero meccanismo di adsorbimento di una data sostanza in una sospensione di terreno. Quando la centrifugazione viene eseguita al modo sopra descritto, i colloidi restano nella fase acquosa e vengono analizzati insieme a quest'ultima, e i dati relativi ai loro effetti vanno perduti.

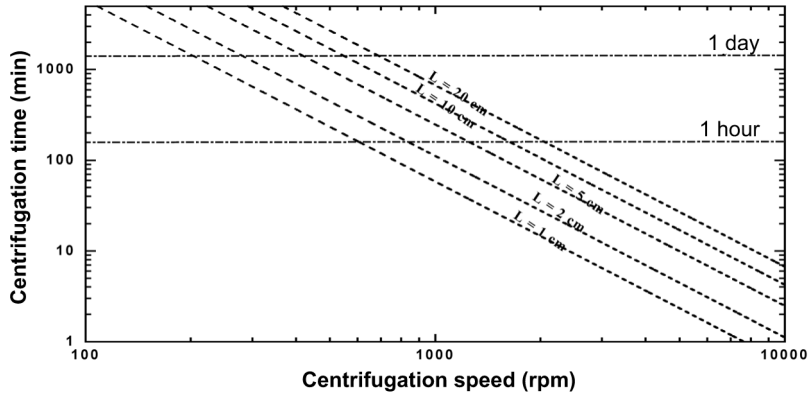
   Se il laboratorio che esegue l'analisi è dotato di strumenti per l'ultracentrifugazione o l'ultrafiltrazione, l'adsorbimento/desorbimento di una sostanza nel terreno può essere studiato più a fondo, per approfondire la maniera in cui la sostanza sotto esame viene adsorbita dai colloidi. In questo caso, per separare le tre fasi (terreno, colloidi, soluzione) si dovrebbe procedere a un'ultracentrifugazione a 60 000 rpm o un'ultrafiltrazione su filtri con pori da 100 000 dalton. La sostanza sotto esame va ricercata in tutte e tre le fasi, perciò il protocollo di sperimentazione dovrebbe essere modificato di conseguenza.

Fig. 1a



Variazione dei tempi di centrifugazione (t) in funzione della velocità di centrifugazione (rpm) per differenti densità (ρ_s). dei terreni R_t = 10 cm, R_b-R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-1} e ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} a 25 °C.

Fig. 1b



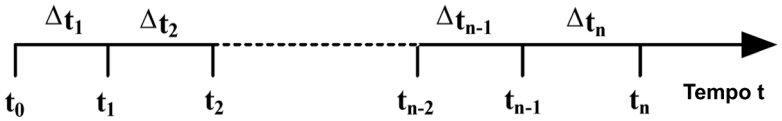
Variazione dei tempi di centrifugazione (t) in funzione della velocità di centrifugazione {rpm) per differenti altezze della miscela nella provetta (R_b-R_t) = L, R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10^{-3} g s^{-1} cm^{-3}, ρ_{aq} = 1,0 g cm^{-3} a 25 °C e ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

▼B

APPENDICE 5

CALCOLO DELL'ADSORBIMENTO A (%) E DEL DESORBIMENTO D (%)

Lo schema cronologico del procedimento è il seguente:



Per tutti i calcoli si parte dal presupposto che la sostanza sotto esame sia stabile e non rimanga significativamente adsorbita sulle pareti del recipiente.

ADSORBIMENTO A (A %)

a) *Metodo in parallelo*

La percentuale di adsorbimento è calcolata per ciascuna provetta (i) a ciascun attimo (t_i), secondo l'equazione:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)\ (^1)$$

I termini di quest'equazione possono essere calcolati come segue:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

dove:

A_{ti} = percentuale di adsorbimento (%) all'attimo t_i

$m_s^{ads}(t_i)$ = massa della sostanza sotto esame sul terreno all'attimo t_i in cui viene eseguita l'analisi (µg)

m_0 = massa della sostanza sotto esame nella provetta, all'inizio della prova (µg)

C_0 = concentrazione di massa iniziale della soluzione sotto esame a contatto col terreno (µg cm^{-3})

(1) Equazione applicabile tanto al metodo diretto quanto al metodo indiretto. Tutte le altre equazioni sono applicabili esclusivamente al metodo indiretto.

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = concentrazione di massa della sostanza nella fase acquosa all'attimo t_i in cui l'analisi viene effettuata (µg cm^{-3}); questa concentrazione viene determinata analiticamente tenendo conto dei valori forniti dai «bianchi»

V_0 = volume iniziale della soluzione di prova a contatto col terreno (cm^3).

I valori della percentuale di adsorbimento A_{t_i} o $C_{aq}^{ads}(t_i)$ vengono riportati graficamente in funzione del tempo, e si determina il tempo dopo il quale viene raggiunto l'equilibrio di sorbimento. Esempi di questi grafici sono riportati rispettivamente nella fig. 1 e fig. 2.

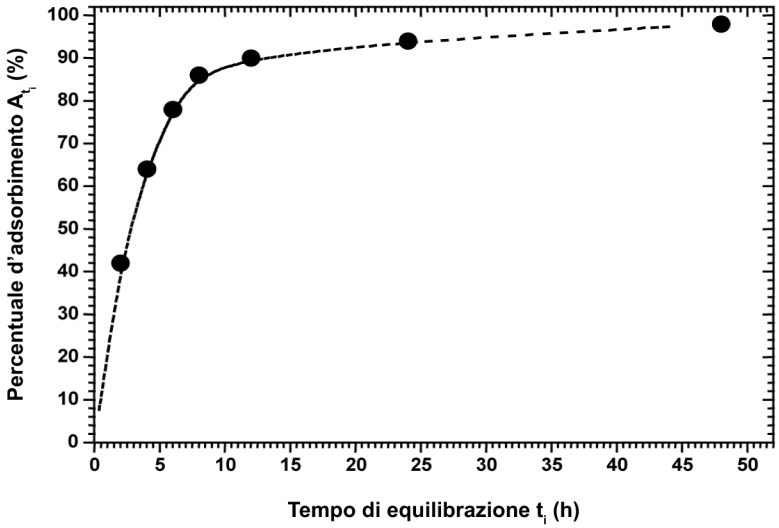


Fig. 1.

Grafico di equilibrio all'adsorbimento

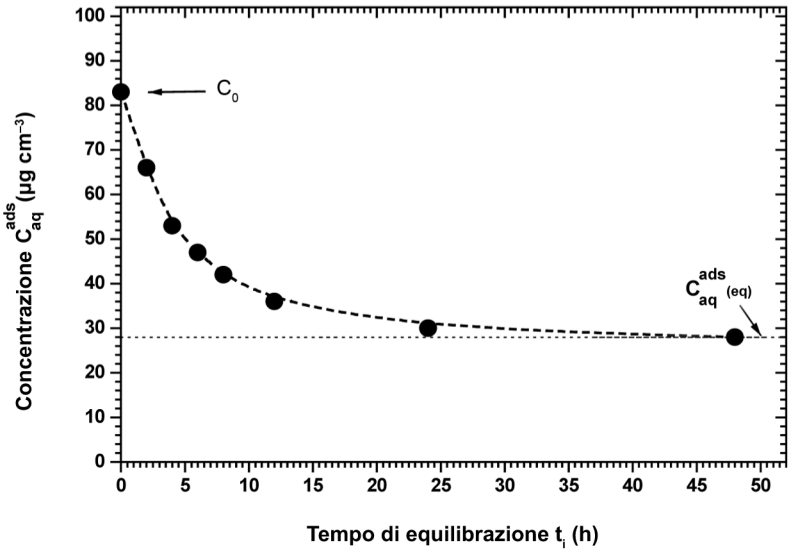


Fig. 2.

Concentrazione di massa della sostanza sotto esame nella fase acquosa (C_{aq}) in funzione del tempo

▼B

b) *Metodo in serie*

Nelle equazioni che seguono si è tenuto conto del fatto che la procedura di adsorbimento viene eseguito attraverso misure della sostanza sotto esame su piccole aliquote della fase acquosa, eseguite a specifici intervalli di tempo.

— Durante ciascun intervallo di tempo, la quantità di sostanza adsorbita dal terreno si calcola come segue:

— per il primo intervallo di tempo $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— per il secondo intervallo di tempo $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— per il terzo intervallo di tempo $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— per l'ennesimo intervallo di tempo $\Delta t_n = t_n - t_n - 1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A)}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— La percentuale di adsorbimento ad ogni intervallo di tempo $A_{\Delta t_i}$, si calcola con l'equazione seguente:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)\ (1)$$

mentre la percentuale di adsorbimento A_{t_i} a un dato attimo t_i si ricava con l'equazione:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (9)(1)$$

Si riportano graficamente i valori dell'adsorbimento A_{t_i} o $A_{\Delta t_i}$ (secondo le necessità dello studio) in funzione del tempo, e si determina il tempo dopo il quale si raggiunge l'equilibrio di sorbimento.

— Al tempo di equilibrio t_{eq}:

— la massa della sostanza sotto esame adsorbita sul terreno è:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)(1)$$

(1) Equazione applicabili tanto al metodo diretto quanto al metodo indiretto. Tutte le altre equazioni sono applicabili esclusivamente al metodo indiretto.

▼B

— la massa della sostanza sotto esame nella soluzione è:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)\ (^1)$$

— la percentuale di adsorbimento all'equilibrio è:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)(^1)$$

I parametri sopra impiegati sono definiti come segue:

$m_s^{ads}(\Delta t_1)$, $m_s^{ads}(\Delta t_2)$, ..., $m_s^{ads}(\Delta t_n)$	=	massa di sostanza adsorbita sul terreno, rispettivamente durante gli intervalli di tempo Δ_{t1}, Δ_{t2},..., Δ_{tn} (μg);
$m_m^{ads}(t_1)$, $m_m^{ads}(t_2)$, ..., $m_n^{ads}(t_n)$	=	massa della sostanza misurata in un'aliquota $v_a{}^A$ rispettivamente agli attimi t_1, t_2, ..., t_n (μg);
$m_s^{ads}(eq)$	=	massa della sostanza adsorbita sul terreno all'equilibrio di adsorbimento (μg);
$m_{aq}^{ads}(eq)$	=	massa della sostanza nella soluzione all'equilibrio di adsorbimento (μg);
$v_a{}^A$	=	volume dell'aliquota nella quale viene misurata la sostanza in esame (cm^3);
$A_{\Delta ti}$	=	percentuale di adsorbimento corrispondente all'intervallo di tempo Δt_1 (%);
A_{eq}	=	percentuale di adsorbimento all'equilibrio (%).

DESORBIMENTO D(%)

Quale tempo iniziale t_0 dell'esperimento di cinetica del desorbimento si considera il momento in cui il massimo volume recuperato della soluzione della sostanza sotto esame (dopo che è stato raggiunto l'equilibrio di adsorbimento) è sostituito da un uguale volume di soluzione di $CaCl_2$ M.

a) *Metodo in parallelo*

All'attimo t_i, si misura la massa della sostanza sotto esame nella fase acquosa prelevata dalla provetta i V_r^i e si calcola la massa desorbita con l'equazione:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i}\right) - m_{aq}^{A} \quad (13)$$

All'equilibrio di desorbimento è $t_i = t_{eq}$, e pertanto è $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

La massa della sostanza sotto esame desorbita durante l'intervallo di tempo (Δt_i) è data dall'equazione:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

La percentuale di desorbimento si calcola:

all'attimo t_i, con l'equazione:

(1) Equazione applicabili tanto al metodo diretto quanto al metodo indiretto. Tutte le altre equazioni sono applicabili esclusivamente al metodo indiretto.

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{15}$$

durante l'intervallo di tempo (Δt_1) con l'equazione:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{16}$$

dove:

D_{ti} = percentuale di desorbimento all'attimo t_i (%)

$D_{\Delta ti}$ = percentuale di desorbimento corrispondente all'intervallo di tempo Δt_1 (%)

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = massa della sostanza sotto esame desorbita all'attimo t_1, (μg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = massa della sostanza sotto esame desorbita durante l'intervallo di tempo Δt_i (μg)

$m_m^{des}(t_i)$ = massa della sostanza sotto esame misurata analiticamente all'attimo t_1 nel volume V_r^i,di soluzione prelevata per l'analisi (μg)

$m_{aq}{}^{A}$ = massa della sostanza sotto esame rimasta all'equilibrio di adsorbimento per effetto dell'incompleta sostituzione del volume (μg)

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \tag{17}$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massa della sostanza sotto esame nella soluzione all'equilibrio ed adsorbimento (μg)

V_R = volume del surnatante eliminato dal tubo dopo che è stato raggiunto l'equilibrio di adsorbimento in sostituzione dello stesso volume di soluzione 0,01 M $CaCl_2$ soluzione (cm^3)

$V_r{}^{i}$ = volume della soluzione prelevata dalla provetta (i) per la misura della sostanza sotto esame, nell'esperimento di cinetica di desorbimento (cm^3).

Si riportano graficamente i valori del desorbimento D_{ti} o $D_{\Delta t_i}$ (secondo le necessità dello studio) in funzione del tempo, e si determina il tempo dopo il quale si raggiunge l'equilibrio di desorbimento.

b) **Metodo in serie**

Le seguenti equazioni tengono conto del fatto che il precedente processo di adsorbimento era stato effettuato misurando la sostanza sotto esame in piccole aliquote (v_a^A) della fase acquosa (cfr. punto 14.9., «1.9. Esecuzione dell'esperimento», metodo in serie). Si ammette quanto segue: a) il volume del surnatante allontanato dal tubo dopo l'esperimento sulla cinetica di adsorbimento è sostituito dallo stesso volume (V_R) di soluzione 0,01 M di $CaCl_2$; b) il volume totale di fase acquosa a contatto col terreno (V_T) durante l'esperimento di cinetica di desorbimento rimane costante ed è espresso dall'equazione:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \tag{18}$$

▼B

All'attimo t_i:

— si misura la massa della sostanza sotto esame in una piccola aliquota (v_a^D) e si calcola la massa desorbita con l'equazione:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— all'equilibrio di desorbimento è $t_i = t_{eq}$ e pertanto è $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

— si calcola la percentuale di desorbimento D_{t_i} con la seguente equazione:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

Per l'intervallo di tempo (Δt_i):

la quantità di sostanza desorbita durante ciascun intervallo di tempo si calcola come segue:

— per il primo intervallo di tempo, $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— per il secondo intervallo di tempo $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) \text{ and}$$

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right] \quad (22)$$

— per l'ennesimo intervallo di tempo, $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right]$$

and

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \quad (23)$$

In conclusione, la percentuale $D_{\Delta t_i}$, di desorbimento per ciascun intervallo di tempo si calcola con l'equazione

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (24)$$

dove la percentuale di desorbimento D_{t_i} all'attimo t_i è data dall'equazione:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (25)$$

▼B

dove i parametri sopra impiegati sono definiti come segue:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = massa della sostanza che rimane rispettivamente adsorbita sul terreno dopo gli intervalli di tempo Δt_1, Δt_2,..., Δt_n (μg)

$m^{des}{}_s(\Delta t_1)$, $m^{des}{}_s(\Delta t_2)$,... , $m^{des}{}_s(\Delta t_n)$ = massa della sostanza di prova rispettivamente desorbita durante gli intervalli di tempo Δt_1, Δt_2,..., Δt_n (μg)

$m^{des}{}_s(t_1)$, $m^{des}{}_s(t_2)$,... , $m^{des}{}_s(t_n)$ = massa della sostanza rispettivamente misurata in un'aliquota ai momenti (v^D_a) t_1,t_2,..., t_n (μg)

V_T = volume totale della fase acquosa a contatto col terreno durante l'esperimento di cinetica di desorbimento effettuato col metodo in serie (cm^3);

$m^A{}_{aq}$ = massa della sostanza sotto esame rimasta dopo l'equilibrio di adsorbimento per effetto della sostituzione incompleta del volume, (μg)

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \qquad (26)$$

V_R = volume del surnatante allontanato dalla provetta dopo il raggiungimento dell'equilibrio di adsorbimento e sostituita dallo stesso volume di soluzione 0,01 M di $CaCl_2$ (cm^3);

v_a^D = volume dell'aliquota prelevata a fini analitici dalla provetta i), durante l'esperimento di cinetica di desorbimento effettuato col metodo in serie (cm^3)

$$v_a^D \leq 0{,}02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

APPENDICE 6

ADSORBIMENTO-DESORBIMENTO NEI SUOLI: FORMULARI DI PRESENTAZIONE DEI RISULTATI

Sostanza esaminata:

Suolo esaminato:

Contenuto in sostanza secca del suolo (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Idoneità del metodo analitico

Suolo pesato	g	
Suolo: massa secca	g	
Volume di soluzione $CaC1_2$	cm^3	
Concentrazione nominale soluzione finale	$\mu g\ cm^{-3}$	
Concentrazione analitica soluzione finale	$\mu g\ cm^{-3}$	

Principio del metodo analitico impiegato:

Taratura del metodo analitico:

Sostanza esaminata:

Suolo esaminato:

Contenuto in sostanza secca del suolo (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Metodologia analitica seguita: Indiretta ☐ In parallelo ☐ In serie ☐

Diretta ☐

Prova di adsorbimento: campioni esaminati

	Simbolo	Unità	Tempo di equilibrazione		Tempo di equilibrazione		Tempo di equilibrazione		Tempo di equilibrazione	
N. della provetta										
Suolo pesato	—	g								
Suolo: massa secca	m_{soil}	g								
Volume d'acqua nel suolo pesato (calcolato)	V_{WS}	cm^3								
Volume di soluzione 0,01 M $CaCl_2$ per equilibrare il suolo		cm^3								
Volume della soluzione di riserva		cm^3								
Volume totale della fase acquosa a contatto col suolo	V_0	cm^3								
Concentrazione iniziale della soluzione di prova	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Massa della sostanza in esame all'inizio della prova	m_0	µg								

▼B

	Simbolo	Unità	Tempo di equilibrazione		Tempo di equilibrazione		Tempo di equilibrazione		Tempo di equilibrazione	
Dopo agitazione e centrifugazione										
METODO INDIRETTO										
Metodo parallelo										
Concentrazione sostanza in esame fase acquosa (compresa correzione del bianco)	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Metodo in serie										
Massa di sostanza in esame misurata nell'aliquota V_a [A]	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
METODO DIRETTO										
Massa della sostanza in esame adsorbita nel suolo	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Concentrazione dell'adsorbimento										
Adsorbimento	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Media										
Coefficiente di adsorbimento	K_d	cm^3 g^{-1}								
Media										
Adsorbimento	K_{oc}	cm^3 g^{-1}								
Media										

Sostanza esaminata:

Suolo esaminato:

Contenuto in sostanza secca del suolo (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Prova di adsorbimento: bianchi e controllo

	Simbolo	Unità	Bianco		Bianco		Controllo	
Provetta N.								
Suoli pesati		g					0	0
Quantità d'acqua nel suolo pesato (calcolata)		cm^3					—	—
Volume di soluzione 0,01 M $CaCl_2$ aggiunta		cm^3						
Volume della soluzione di riserva della sostanza in esame aggiunta		cm^3	0	0				
Volume totale della fase acquosa (calcolata)		cm^3					—	—

▼B

	Simbolo	Unità	Bianco		Bianco		Controllo	
Concentrazione iniziale della sostanza in esame della fase acquosa		$\mu g\ cm^{-3}$						

Dopo agitazione e centrifugazione

Concentrazione nella fase acquosa		$\mu g\ cm^{-3}$						

Osservazione: aggiungere colonne se necessario.

Sostanza esaminata:

Suolo esaminato:

Contenuto in sostanza secca del suolo (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: °C

Bilancio di massa

	Simbolo	Unità				
Provetta n.						
Suolo pesato	—	g				
Suolo: massa secca	m_{soil}	g				
Volume d'acqua nel suolo pesato (calcolato)	V_{WS}	ml				
Volume di soluzione 0,01 M $CaCl_2$ per equilibrare il suolo		ml				
Volume della soluzione di riserva		cm^3				
Volume totale della fase acquosa a contatto col suolo	V_0	cm^3				
Concentrazione iniziale della soluzione in esame	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$				
Tempo di equilibrazione	—	h				

Dopo agitazione e centrifugazione

Concentrazione della sostanza in esame. Fase acquosa all'equilibrio di adsorbimento, compresa la correzione per il bianco	$C_{aq}^{ads}(eq)$	$\mu g\ cm^{-3}$				
Tempo di equilibrazione	t_{eq}	h				
1ª diluizione con solvente						
Volume eliminato di fase acquosa	V_{rec}	cm^3				
Volume aggiunto di solvente	ΔV	cm^3				
1ª estrazione col solvente						
Segnale analizzato nel solvente	S_{E1}	var.				
Concentrazione della sostanza in esame nel solvente	C_{E1}	$\mu g\ cm^{-3}$				

▼B

	Simbolo	Unità				
Massa della sostanza estratta dal suolo e dalle pareti del recipiente	m_{E1}	µg				
2ª diluizione col solvente						
Volume di solvente eliminato	ΔV_s	cm^3				
Volume di solvente aggiunto	$\Delta V'$	cm^3				
2ª estrazione col solvente						
Segnale analizzato nella fase solvente	S_{E2}	var.				
Concentrazione della sostanza in esame nel solvente	C_{E2}	µg cm^{-3}				
Massa della sostanza estratta dal suolo e dalle pareti del recipiente	m_{E2}	µg				
Massa totale della sostanza in esame estratta in due fasi	m_E	µg				
Bilancio di massa	MB	%				

Sostanza esaminata:

Suolo esaminato:

Contenuto in sostanza secca del suolo (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: .....°C

Isoterme di adsorbimento

	Simbolo	Unità								
Provetta n.										
Suolo pesato	—	g								
Suolo: massa secca	E	g								
Volume dell'acqua nel suolo pesato (calcolato)	V_{WS}	cm^3								
Volume di soluzione di 0,01 $CaCl_2$ M necessaria per equilibrare il suolo		cm^3								
Volume di soluzione di riserva aggiunto		cm^3								
Volume totale di fase acquosa a contatto col suolo (calcolato)	V_0	cm^3								
Soluzione della concentrazione	C_0	µg cm^{-3}								
Tempo di equilibrio	—	h								

▼B

	Simbolo	Unità								
Dopo agitazione e centrifugazione										
Concentrazione della sostanza nella fase acquosa, compresa la correzione per il bianco	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Temperatura		°C								
Massa adsorbita per unità di suolo	$C_{s}^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Analisi di regressione:

valore di K_F^{ads}:

valore di 1/n:

coefficiente di regressione r^2:

Sostanza esaminata:

Suolo esaminato:

Contenuto in sostanza secca del suolo (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatura: ..... °C

Metodologia analitica seguita: Indiretta ☐ Parallel ☐ In serie ☐

Prova di desorbimento

		Simbolo	Unità	Intervallo di tempo	Intervallo di tempo	Intervallo di tempo	Intervallo di tempo
N. della provetta proveniente dallo stadio di adsorbimento							
Massa della sostanza adsorbita sul suolo all'equilibrio di adsorbimento		$m_s^{ads}(eq)$	µg				
Volume di fase acquosa eliminato e sostituito da 0,01 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Volume totale di fase acquosa a contatto col suolo	PM	V_0	cm^3				
	SM	v_T	cm^3				
Massa della sostanza in esame rimasta dopo l'equilibrio di adsorbimento per effetto della sostituzione incompleta del volume		m_{aq}^A	µg				
Cinetica di desorbimento							
Massa misurata di sostanza desorbita dal suolo al momento t_i		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Volume della soluzione prelevata dalla provetta (i) per la misura della sostanza in esame	PM	V_f^i	cm^3				
	SM	V_a^D	cm^3				
Massa della sostanza desorbita dal suolo al momento t_i (calcolata)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Massa della sostanza desorbita dal suolo durante l'intervallo di tempo Δt_i (calcolata)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Simbolo	Unità	Intervallo di tempo	Intervallo di tempo	Intervallo di tempo	Intervallo di tempo
Percentuale di desorbimento						
Desorbimento al tempo t_i	D_{t_i}	%				
Desorbimento nell'intervallo di tempo di Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Coefficiente di desorbimento apparente	K_{des}					

PM: Metodo in parallelo.

SM: Metodo in serie.

▼B

C.19. STIMA DEL COEFFICIENTE DI ADSORBIMENTO (k_{OC}) SUL TERRENO E SUI FANGHI DI ACQUE DA SCARICO MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESTAZIONE (HPLC)

1. METODO

Il metodo qui descritto corrisponde al TG121 (2001) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Le caratteristiche di adsorbimento delle sostanze presenti nei terreni o nei fanghi di acque da scarico possono essere descritte con parametri determinati per via sperimentale tramite il metodo di prova C.18. Un parametro importante è il coefficiente di adsorbimento, definito come il rapporto tra la concentrazione di una sostanza nel suolo/fango e la concentrazione della sostanza stessa nella fase acquosa all'equilibrio di adsorbimento. Il coefficiente di adsorbimento K_{oc} normalizzato al contenuto di carbonio organico del terreno è un buon indicatore della capacità a formare legami di una sostanza chimica alla componente organica del suolo e dei fanghi di acque da scarico e permette di fare confronti tra diverse sostanze chimiche. Questo parametro può essere stimato mediante correlazioni con la solubilità in acqua e con il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Il metodo sperimentale descritto in questo test consente di stimare il coefficiente di adsorbimento K_{oc} nel suolo e nei fanghi di acque da scarico mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) (8). L'affidabilità dei valori stimati con questo metodo è superiore a quella ottenuta tramite QSAR. (relazione quantitativa struttura-attività) (9). Trattandosi di un metodo di stima, non può sostituire completamente gli esperimenti di equilihrio in batch usati nel metodo di prova 18. Tuttavia, stimare il valore K_{oc} può essere utile nella scelta dei parametri più appropriati per gli studi di adsorbimento-desorbimento secondo il metodo di prova C.18 e a tal fine si calcola il valore K_d (coefficiente di distribuzione) o K_f (coefficiente di adsorbimento di Freundlich) in base all'equazione 3 (cfr. punto 1.2).

1.2. DEFINIZIONI

K_d: si definisce coefficiente di distribuzione il rapporto tra le concentrazioni all'equilibrio C di una sostanza in esame disciolta in un sistema a due fasi composto da un mezzo adsorbente (terreno o fanghi di acque da scarico) e una fase acquosa; è un valore adimensionale quando le concentrazioni in entrambe le fasi sono espresse in termini di peso/peso. Se la concentrazione nella fase acquosa è indicata in termini di peso/volume, il valore sarà espresso in unità ml g^{-1}. Il valore di K_d può variare in base alle proprietà di adsorbimento e col variare della concentrazione.

$$K_d = \frac{C_{suolo}}{C_{aq}} \; or \; \frac{C_{fango}}{C_{aq}} \qquad (1)$$

dove:

C_{suolo} = concentrazione della sostanza in esame nel terreno all'equilibrio (µg· g^{-1})

C_{fango} = concentrazione della sostanza in esame nel fango all'equilibrio (µg· g^{-1})

C_{aq} = concentrazione della sostanza in esame nella fase acquosa all'equilibrio (µg· g^{-1}, µg· ml^{-1}),

▼B

K_f: il coefficiente di adsorbimento di Freundlich è definito come la concentrazione della sostanza in esame nel suolo o nei fanghi di acque da scarico (x/m) quando la concentrazione all'equilibrio nella fase acquosa C_{aq} è uguale a uno; le unità si riferiscono a $\mu g \cdot g^{-1}$ di sostanza adsorbente. Il valore può variare in base alle proprietà adsorbenti.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n \cdot \log C_{aq}}. \quad (2)$$

dove:

x/m = quantità (in μg) di sostanza in esame x adsorbita a contatto con una quantità (in g) di sostanza adsorbente m all'equilibrio

l/n = pendenza dell'isoterma di adsorbimento di Freundlich

C_{aq} = concentrazione della sostanza in esame nella fase acquosa all'equilibrio ($\mu g \cdot ml^{-1}$)

$$AtC_{aq} = 1;\ \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc}: il coefficiente di distribuzione (K_d) o il coefficiente di adsorbimento di Freundlich (K_f) normalizzati al contenuto di carbonio organico (f_{oc}) della sostanza adsorbente; specialmente per le sostanze chimiche non ionizzate fornisce un'indicazione approssimativa dell'entità di adsorbimento tra una sostanza e il mezzo adsorbente e consente di effettuare confronti tra diverse sostanze chimiche. A seconda delle dimensioni di K_d e K_f, K_{oc} può essere un valore adimensionale o essere espresso in $\mu g \cdot g^{-1}$ di sostanza organica.

$$Koc = \frac{Kd}{foc}\ (\text{valore adimensionale o} \cdot g^{-1}) \text{or} \frac{Kf}{foc}\ (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (3)$$

La relazione tra K_{oc} e K_d non è sempre lineare, pertanto i valori di K_{oc} possono variare da terreno a terreno, anche se la loro variabilità è notevolmente minore rispetto i valori di K_d o di K_f.

Il coefficiente di adsorbimento (K_{oc}) viene ricavato dal fattore di capacità (k') usando un diagramma di taratura log k'/log K_{oc} dei composti di riferimento selezionati.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

dove:

t_R = tempo di ritenzione in HPLC del test e della sostanza di riferimento (minuti)

t_0 = tempo morto in HPLC (minuti) (cfr. punto 1.8.2).

P_{ow}: il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua è definito come il rapporto tra le concentrazioni di una sostanza disciolta in n-ottanolo e quella disciolta in acqua; si tratta di una valore adimensionale

$$P_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{aq}}\ (= K_{ow}) \quad (5)$$

1.3. SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Prima di applicare il metodo è opportuno conoscere la formula di struttura, la purezza e la costante di dissociazione (se la sostanza è ionizzabile). Sono utili anche informazioni sulla solubilità in acqua e in solventi organici, sul coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua e sulle caratteristiche di idrolisi.

▼B

Per stabilire una correlazione tra i tempi di ritenzione in HPLC che riguardano la sostanza in esame con il suo coefficiente di adsorbimento K_{oc} occorre costruire un grafico di taratura log K_{oc}/log k' che comprenda almeno sei punti di riferimento, di cui almeno uno al di sopra e uno al di sotto del valore previsto per la sostanza in esame. L'accuratezza del metodo può essere migliorata in modo significativo utilizzando sostanze di riferimento che presentino affinità strutturali con la sostanza in esame. Se tali dati non sono disponibili, la selezione delle sostanze di taratura è affidata al giudizio dell'operatore. In tal caso è consigliabile scegliere una serie più generale di sostanze strutturalmente eterogenee. Le sostanze e i valori di K_{oc} che possono essere utilizzati per i fanghi di acque da scarico e per il terreno sono elencati, rispettivamente, nella tabella 1 e nella tabella 3 dell'appendice. La scelta di altre sostanze di riferimento va motivata.

1.4. PRINCIPIO DEL METODO UTILIZZATO

L'HPLC viene eseguita con colonne analitiche impaccate con una fase solida commerciale di cianopropile contenente gruppi lipofili e polari. Si utilizza inoltre una fase stazionaria moderatamente polare su una matrice di silice:

— O— Si	— CH_2 — CH_2 — CH_2	— CN
silice	spaziatore non polare	gruppo polare

Il principio del metodo è analogo al metodo di prova A.8 (coefficiente di ripartizione, metodo per HPLC). Durante il passaggio nella colonna insieme alla fase mobile la sostanza in esame interagisce con la fase stazionaria. La ripartizione tra la fase mobile e la fase stazionaria provoca un rallentamento della sostanza in esame. La doppia composizione della fase stazionaria, che ha gruppi polari e non polari, consente l'interazione tra i gruppi polari e non polari di una molecola in maniera analoga a quanto avviene per le sostanze organiche nelle matrici di terreno o di fango. Ciò permette di stabilire una relazione tra il tempo di ritenzione in colonna ed il coefficiente di adsorbimento sulla sostanza organica.

Il pH influenza in maniera significativa le caratteristiche di adsorbimento, specie per le sostanze polari. Nei terreni agricoli o nei collettori degli impianti di trattamento dei fanghi di acque da scarico il pH varia normalmente tra 5,5 e 7,5. Per le sostanze ionizzabili, nei casi in cui almeno il 10 % del composto in esame verrà dissociato nel range di pH compreso tra 5,5 e 7,5, occorre eseguire due test, uno sulla forma ionizzata e l'altro sulla forma non ionizzata, utilizzando soluzioni tampone adeguate.

Poiché la relazione tra il tempo di ritenzione nella colonna per HPLC e il coefficiente di adsorbimento è il solo criterio impiegato per la stima, non è necessario ricorrere a metodi analitici quantitativi, ma basta solo la determinazione del tempo di ritenzione. Avendo a disposizione un gruppo adeguato di sostanze di riferimento e potendo applicare condizioni sperimentali standard, il metodo offre una tecnica rapida ed efficiente per stimare il coefficiente di adsorbimento K_{oc}.

1.5. APPLICABILITÀ DEL TEST

Il metodo per HPLC è applicabile a sostanze chimiche (marcate o non marcate) per cui è disponibile un sistema di rilevazione adeguato (ad esempio spettrofotometro o rilevatore di radioattività) e che siano sufficientemente stabili per tutta la durata dell'esperimento. Può rivelarsi particolarmente utile per sostanze chimiche difficili da studiare con altri sistemi sperimentali (ad esempio sostanze volatili, sostanze non solubili in acqua ad una concentrazione analiticamente misurabile, sostanze con elevata affinità verso la superficie dei sistemi di incubazione). Il metodo è applicabile a miscele che danno bande di eluizione non risolte. In tal caso è opportuno determinare il limite superiore e inferiore del valore log K_{oc} dei composti della miscela di prova.

▼B

Le impurezze possono talvolta interferire con l'interpretazione dei risultati HPLC, ma ciò non ha rilievo particolare purché la sostanza in esame possa essere chiaramente identificata e separata dalle impurezze.

Il metodo è convalidato per le sostanze elencate nella tabella 1 dell'appendice ed è stato anche applicato ad una serie di sostanze delle seguenti classi chimiche:

— ammine aromatiche (ad esempio trifluralin, 4-cloroanilina, 3,5-dinitroanilina, 4-metilanilina, N-metilanilina, 1-naftilammina),

— esteri degli acidi carbossilici aromatici (ad esempio estere metilico dell'acido benzoico, estere etilico dell'acido 3,5-dinitrobenzoico),

— idrocarburi aromatici (ad esempio toluene, xilene, etilbenzene, nitrobenzene),

— esteri dell'acido arilossifenossipropionico (ad esempi diclofop-metile, fenoxaprop-etile, fenoxaprop-P-etile),

— fungicidi a base di benzimidazolo e imidazolo (ad esempio carbendazim, fuberidazole, triazoxide),

— ammidi degli acidi carbossilici (ad esempio 2-clorobenzammide, N,N-dimetilbenzammide, 3,5-dinitrobenzammide, N-metilbenzammide, 2-nitrobenzammide, 3-nitrobenzammide),

— idrocarburi clorurati (ad esempio endosulfan, DDT, esaclorobenzene, quintozene, 1,2,3-triclorobenzene),

— insetticidi organofosforati (ad esempio azinfos-metile, disulfoton. fenamifos. isofenfos. pirazofos, sulprofos, triazofos).

— fenoli (ad esempio fenolo. 2-nitrofenolo, 4-nitrofenolo, pentaclorofenolo. 2,4,6-triclorofenolo, I-naftolo),

— derivati della fenilurea (ad esempio isoproturon, monolinuron, pencicuron).

— coloranti di pigmentazione (ad esempio Giallo Acido 219, Blu Basico 41. Rosso Diretto 81),

— idrocarburi poliaromatici (ad esempio acenaftene, naftalene),

— erbicidi a base di 1,3,5-triazina (ad esempio prometryn, propazina, simazina, terbutrin),

— derivati del triazolo (ad esempio tebuconazolo, triadimefon, tradimenol, triapenthenol).

Il metodo non è applicabile a sostanze che reagiscono con l'eluente o con la fase stazionaria, né a sostanze che interagiscono in maniera specifica con i componenti inorganici (ad esempio formazione di cluster complessi con i minerali delle argille). Il metodo potrebbe non funzionare per le sostanze tensioattive, i composti inorganici e le basi e gli acidi organici moderati e forti. Sono determinabili i valori di log K_{oc} compresi tra 1,5 e5,0. Le sostanze ionizzabili devono essere testate usando una fase mobile tamponata, ma occorre procedere con la massima cura per evitare la precipitazione di componenti del tampone o della sostanza in esame.

▼B

1.6. CRITERI QUALITATIVI

1.6.1. **Accuratezza**

Normalmente la stima del coefficiente di adsorbimento può raggiungere una precisione di ± 0,5 unità logaritmiche del valore determinato con il metodo di equilibrio in batch (cfr. la tabella 1 nell'appendice). Si può ottenere una maggior accuratezza utilizzando come riferimento sostanze strutturalmente analoghe alla sostanza in esame.

1.6.2. **Ripetibilità**

Le determinazioni devono essere eseguite almeno due volte. I valori di log K_{oc} ricavati dalle singole misurazioni dovrebbero essere compresi entro un range di 0,25 unità logaritmiche.

1.6.3. **Riproducibilità**

L'esperienza finora acquisita nell'applicazione del metodo ne conferma la validità. Da uno studio di validazione del metodo per HPLC usando 48 sostanze (in prevalenza pesticidi), per le quali erano disponibili dati affidabili relativi al K_{oc} sul terreno, è risultato un coefficiente di correlazione di R = 0,95 (10) (11).

Per migliorare e validare il metodo è stato effettuato un test a cui hanno partecipato 11 laboratori (12). I risultati sono riportati nella tabella 2 dell'appendice.

1.7. DESCRIZIONE DEL METODO UTILIZZATO

1.7.1. **Stima preliminare del coefficiente di adsorbimento**

Il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua P_{ow} (= K_{ow}) e, entro certi limiti, la solubilità in acqua, possono servire da indicatori dell'entità dell'adsorbimento, soprattutto per le sostanze non ionizzate, e quindi essere utilizzati per l'identificazione preliminare del range. Sono state pubblicate una serie di utili correlazioni per diversi gruppi di sostanze chimiche (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. **Apparecchiatura**

E richiesto un apparecchio per cromatografia liquida dotato di pompa pulse-free e di un sistema di rilevazione adeguato. Si raccomanda l'utilizzo di una valvola di iniezione con loop. Occorre utilizzare resine legate a cianopropile, comunemente disponibili in commercio, su una base di silice (ad esempio Hypersil e Zorbax CN). Tra il sistema di iniezione e la colonna analitica è possibile inserire una precolonna dello stesso materiale. L'efficienza di separazione della colonna può variare in modo significativo a seconda della casa produttrice. Si tenga presente che, indicativamente, la colonna deve raggiungere i seguenti fattori di capacità k': log k' > 0,0 per log K_{oc} = 3,0 e log k' > 0,4 per log K_{oc} = 2,0 con una fase mobile metanolo/acqua 55/45 %.

1.7.3. **Fasi mobili**

A seguito di test effettuati su diverse fasi mobili. si raccomandano le due seguenti:

— metanolo/acqua (55/45 % v/v),

— metanolo/soluzione tampone citrato 0,01 M a pH 6,0 (55/45 % v/v).

▼B

Il solvente di eluizione viene preparato con metanolo per HPLC e acqua distillata o tampone citrato. Prima dell'uso la miscela viene sottoposta a degasaggio. Si consiglia di optare per l'eluizione isocratica. Nel caso le miscele metanolo/acqua non siano adeguate, è possibile provare altre miscele di solvente organico/acqua, come miscele di etanolo/acqua o acetonitrile/acqua. Per i composti ionizzabili si raccomanda l'uso di soluzioni tampone allo scopo di stabilizzare il pH. È importante osservare tutte le precauzioni necessarie per evitare la precipitazione di sali e il deterioramento della colonna, che si possono verificare con alcune miscele di fase organica/soluzione tampone.

Non è consentito l'uso di additivi quali ad esempio i reagenti ione pair che possono modificare le proprietà di adsorbimento della fase stazionaria. Tali modifiche possono essere irreversibili. Per questo motivo è necessario che gli esperimenti che prevedono l'uso di additivi vengano condotti su colonne separate.

1.7.4. **Soluti**

Le sostanze in esame e di riferimento devono essere sciolte nella fase mobile.

1.8. ESECUZIONE DEL TEST

1.8.1. **Condizioni**

È bene registrare la temperatura durante le misurazioni. Si raccomanda in modo particolare l'uso di un comparto colonne a temperatura controllata per garantire condizioni costanti durante i cicli di esecuzione della taratura, delle corse e delle misurazioni sulla sostanza in esame.

1.8.2. **Determinazione del tempo morto t_o**

Il tempo morto t_o può essere determinato con due metodi diversi (cfr. anche il punto 1.2).

1.8.2.1. *Determinazione del tempo morto t_o mediante serie omologa*

È comprovato che con questa procedura i valori di t_o sono affidabili e standardizzati. Per maggiori dettagli, consultare il metodo di prova A.8: coefficiente di ripartizione (n-ottanolo/acqua), metodo per HPLC.

1.8.2.2. *Determinazione del tempo morto t_o mediante sostanze inerti non trattenute dalla colonna*

Questa tecnica si basa sull'iniezione di formammide, urea o nitrato di sodio. Le misurazioni devono essere eseguite almeno due volte.

1.8.3. **Determinazione dei tempi di ritenzione t_R**

Selezionare le sostanze di riferimento secondo le modalità descritte nel punto 1.3. Queste sostanze sono iniettabili sotto forma di miscela standard, purché esista una conferma che il tempo di ritenzione di ciascuno standard di riferimento non sia influenzato dalla presenza degli altri. Effettuare la taratura a intervalli regolari almeno due volte al giorno, in modo da considerare eventuali variazioni impreviste nelle prestazioni della colonna. È buona prassi eseguire le iniezioni di taratura prima e dopo le iniezioni della sostanza in esame per escludere eventuali derive dei tempi di ritenzione. Iniettare le singole sostanze in esame nella minor quantità possibile (per evitare un sovraccarico della colonna) e determinare i relativi tempi di ritenzione.

▼B

Per aumentare l'affidabilità delle misurazioni, ripetere le determinazioni almeno due volte. I valori di log K_{oc} ricavati dalle singole misurazioni dovrebbero essere compresi entro un range di 0,25 unità logaritmiche.

1.8.4. **Valutazione**

I fattori di capacità k' vengono ricavati dal tempo morto t_o e dai tempi di ritenzione t_R delle sostanze di riferimento selezionate secondo l'equazione 4 (cfr. il punto 1.2). Successivamente si costruisce un grafico log k'/log K_{oc} ottenuti dagli esperimenti di equilibrio in batch riportati nelle tabelle 1 e 3 dell'appendice. Servendosi di questo grafico, si utilizza il valore di log k' della sostanza in esame per determinare il rispettivo valore di log K_{oc} (interpolazione). Se i risultati mostrano che log K_{uc} della sostanza in esame esce dal range di taratura, occorre ripetere il test usando altre sostanze di riferimento più appropriate.

2. **DATI E RELAZIONE**

La relazione deve contenere le seguenti informazioni:

— identità della sostanza in esame e delle sostanze di riferimento, relativa purezza e valori pK_a. per composti ionizzabili,

— descrizione della strumentazione e delle condizioni operative, ad esempio tipo e dimensioni della colonna (e precolonna) analitica, mezzi di rivelazione, fase mobile (rapporto dei componenti e pH), intervallo di temperatura durante le misurazioni,

— tempo morto e relativo metodo di determinazione,

— quantità delle sostanze in esame e di riferimento introdotte nella colonna,

— tempi di ritenzione dei composti di riferimento usati per la taratura,

— dettagli sulla retta di regressione approssimata (log k' in rapporto a log K_{oc}) e rappresentazione grafica della retta di regressione,

— dati sui tempi medi di ritenzione e valore stimato di d log K_{oc} riferito al composto in esame,

— cromatogrammi.

3. **BIBLIOGRAFIA**

(1) W.J. Lyman, W.F. Reehl. D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N.A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1 67.

(3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(4) C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, pp. 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp. 297-312.

▼B

(6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V.H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for non-ionic organic compounds, Science, 106, pp. 831-832.

(7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, pp. 833-846.

(8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), pp. 2341-2352.

(11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, pp. 285-304.

(12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

▼B

APPENDICE

Tabella 1

Confronto tra i valori di K_{oc} per i terreni e i fanghi di acque da scarico e i valori calcolati con il metodo di screening per HPLC ([1]) ([2])

Sostanza	N.CAS	Log K_{oc} fanghi di acque da scarico	Log K_o HPLC	Δ	Log K_{oc} terreni	Log K_{oc} HPLC	Δ
Atrazina	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fention	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantrene	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Acido benzoico fenilestere	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzammide	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-nitrobenzammide	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilide	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilina	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-dicloroanilina	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

([1]) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.
([2]) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges Chemosphere, 3 5 (1/2), pp. 107-119.

Tabella 2

Risultati di un test comparativo fra laboratori (11 laboratori partecipanti) eseguito per migliorare e validare il metodo per HPLC ([1])

Sostanza	N.CAS	Log K_{Oc}:	K_{oc}	Log K_{oc}
		[OCSE 106]	[Metodo HPLC]	
Atrazina	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapenthenol	776O8-8S-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fention	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

([1]) W. Kördel, G, Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

▼B

Tabella 3

Sostanze di riferimento raccomandate per il metodo di screening per HPLC in base ai dati sull'adsorbimento del suolo

Sostanza di riferimento	N.CAS	Valori medi di log K_{oc} ottenuti dall'equilibrio in batch	Numero di dati relativi a K_{oc}	Log S.D.	Fonte
Acetanilide	103-84-4	1,25	4	0,48	(a)
Fenolo	108-95-2	1,32	4	0,70	(a)
2-nitrobenzammide	610-15-1	1,45	3	0,90	(b)
N, N-dimetilbenzammide	611-74-5	1,52	2	0,45	(a)
4-metilbenzammide	619-55-6	1,78	3	1,76	(a)
Benzoato di metile	93-58-3	1,80	4	1,08	(a)
Atrazina	1912-24-9	1,81	3	1,08	(c)
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	(c)
3-nitrobenzammide	645-09-0	1,95	3	1,31	(b)
Anilina	62-53-3	2,07	4	1,73	(a)
3,5-dinitrobenzammide	121-81-3	2,31	3	1,27	(b)
Carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	(c)
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	(c)
Triazoxide	72459-58-6	2,44	3	1,66	(c)
Triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	(c)
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	(c)
Naftalene	91-20-3	2,75	4	2,20	(a)
Endosulfan-diolo	2157-19-9	3,02	5	2,29	(c)
Metiocarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	(c)
Giallo Acido 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	(a)
1,2,3-triclorobenzene	87-61-6	3,16	4	1,40	(a)
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	(a)
Fention	55-38-9	3,31	3	2,49	(c)
Rosso Diretto 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(a)
Pirazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	(c)
α-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	(c)
Diclofop-metile	51338-27-3	4,20	3	3,77	(c)
Fenantrene	85-01-8	4,09	4	3,83	(a)
Blu Basico 41 (miscela)	26S50-47-5 12270-l 3-2	4,89	4	4,46	(a)
DDT	50-29-3	5,63	1	—	(b)

(a) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten, organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01044 (1994).
(b) B.V. Oeper, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 21 pp. 285-304.
(c) Dati fomiti dalle industrie.

▼M7

C.20. PROVA DI RIPRODUZIONE CON *DAPHNIA MAGNA*

INTRODUZIONE

Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 211 (2012). Le linee guida dell'OCSE per le prove dei prodotti chimici sono periodicamente rivedute e aggiornate alla luce del progresso scientifico. La linea guida n. 211 sulla prova di riproduzione deriva dalla linea guida n. 202, parte II, Prova di riproduzione con *Daphnia sp*. (1984). È generalmente riconosciuto che i dati derivanti da prove effettuate secondo la linea guida n. 202 possono essere variabili. Per questa ragione sono stati intrapresi notevoli sforzi per identificare i motivi alla base di questa variabilità, con l'obiettivo di produrre un metodo di prova migliore. La linea guida n. 211 si basa sui risultati di tali attività di ricerca, su prove interlaboratorio e su studi di validazione effettuati nel 1992 (1), 1994 (2) e 2008 (3).

Le principali differenze tra la versione iniziale (linea guida n. 202, 1984) e la seconda versione (linea guida n. 211, 1998) della linea guida sulla prova di riproduzione sono le seguenti:

— la specie raccomandata da utilizzare è la *Daphnia magna*;

— la durata della prova è di 21 giorni;

— per le prove semistatiche, il numero di animali da utilizzare per ciascuna concentrazione di prova è stato ridotto, passando da almeno 40, preferibilmente suddivisi in quattro gruppi di 10 animali, ad almeno 10 animali trattati individualmente (sebbene sia possibile utilizzare diversi modi operativi per le prove a flusso continuo);

— sono state formulate raccomandazioni più specifiche in merito al mezzo di prova e alle condizioni di alimentazione.

— Le principali differenze tra la seconda versione della linea guida sulla prova di riproduzione (n. 211, 1998) e la presente versione sono le seguenti:

— è stata aggiunta l'appendice 7 per descrivere le procedure per l'identificazione del sesso dei neonati, se necessario. In linea con le precedenti versioni del presente metodo di prova il rapporto numerico tra i sessi è un endpoint facoltativo;

— la variabile di risposta espressa dal numero di piccoli vivi prodotti da ciascun animale genitore superstite è stata completata con l'aggiunta di una variabile di risposta supplementare inerente alla riproduzione della *Daphnia*, vale a dire il numero totale di piccoli vivi prodotti alla fine del test da ciascuna *Daphnia* riproduttrice presente all'inizio del test, escludendo dall'analisi la mortalità parentale accidentale e/o casuale. Questa variabile di risposta è stata aggiunta allo scopo di allineare questo parametro con gli altri metodi di prova sulla riproduzione di invertebrati. Inoltre, il presente metodo di prova consente di eliminare una fonte di errore che incide su questa variabile, ossia l'effetto della mortalità parentale casuale e/o accidentale eventualmente osservata durante il periodo di esposizione.

— Sono state aggiunte altre indicazioni statistiche per il disegno sperimentale e per il trattamento dei risultati, sia per l'EC_x (es. EC_{10} o EC_{50}) sia per l'approccio basato sulla NOEC/LOEC.

— È stata inserita una prova limite.

L'appendice 1 contiene le definizioni dei termini utilizzati.

PRINCIPIO DELLA PROVA

Il principale obiettivo della prova è valutare l'effetto delle sostanze chimiche sulla capacità riproduttiva di *Daphnia magna*. A tal fine giovani femmine di *Daphnia* (animali riproduttori), di età inferiore alle 24 ore al momento dell'inizio della prova, vengono esposte alla sostanza chimica in esame aggiunta all'acqua a un intervallo di concentrazioni diverse. La durata della prova è di 21 giorni. Alla fine della prova, viene verificato il numero totale di piccoli vivi prodotti. La capacità riproduttiva degli animali parentali può essere espressa in altri modi (ad esempio, con il numero dei piccoli vivi prodotti giornalmente da ciascun animale a partire dal primo giorno di comparsa della prole) ma questi dati dovrebbero essere riportati solo ad integrazione del numero totale di piccoli vivi prodotti alla

▼M7

fine del test. A causa della particolare concezione della prova semistatica rispetto ad altri metodi di prova sulla riproduzione di invertebrati, è altresì possibile contare il numero di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore. In questo modo, contrariamente ad altri metodi di prova sulla riproduzione di invertebrati, è possibile escludere dalla valutazione i dati corrispondenti alla prole di un animale riproduttore che muoia accidentalmente e/o casualmente durante il periodo di prova. Di conseguenza, in presenza di mortalità parentale nelle repliche esposte si deve stabilire se essa segue un modello concentrazione-risposta, ad esempio se vi è una significativa regressione della risposta rispetto alla concentrazione della sostanza chimica in esame con una pendenza positiva (è possibile utilizzare una prova statistica quale il test di Cochran-Armitage per le tendenze). Se la mortalità non segue un modello concentrazione-risposta, le repliche che presentano mortalità parentale vanno escluse dall'analisi del risultato della prova. Se la mortalità segue un modello concentrazione-risposta, la mortalità parentale è assimilata a un effetto della sostanza chimica in esame e le repliche non vanno escluse dall'analisi. Se l'animale riproduttore si rivela essere un maschio, o se muore durante la prova sia accidentalmente, per incuria o incidente, sia casualmente a causa di un incidente che non trova spiegazione e che non è collegato all'effetto della sostanza chimica in esame, questa replica viene esclusa dall'analisi (per saperne di più, cfr. paragrafo 51). L'eventuale effetto tossico della sostanza chimica in esame sul tasso di riproduzione è misurato da valori espressi come ECx, eseguendo, per regressione non lineare, un aggiustamento dei dati a un modello adeguato allo scopo di calcolare la concentrazione che causerebbe x % di riduzione del tasso riproduttivo, o in alternativa dal valore NOEC/LOEC (4). *Le concentrazioni di prova devono comprendere le più basse concentrazioni con effetto utilizzate (ad esempio EC_{10}), il che significa che questo valore è calcolato per interpolazione e non per estrapolazione.*

Vanno riportati anche la sopravvivenza degli animali riproduttori e il tempo intercorso fino alla produzione della prima schiusa. È possibile esaminare altri effetti della sostanza chimica su parametri quali la crescita (per es. la lunghezza) e, possibilmente, il tasso intrinseco di aumento della popolazione (cfr. paragrafo 44).

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA CHIMICA IN ESAME

I risultati di un test di tossicità acuta (cfr. capitolo C.2 del presente allegato: Saggio di immobilizzazione acuta in *Daphnia sp.*) effettuato su *Daphnia magna* possono essere utili per selezionare l'adeguato intervallo di concentrazioni di prova da utilizzare nei test sulla riproduzione. È necessario conoscere la solubilità in acqua e la pressione di vapore della sostanza chimica in esame e deve essere disponibile un metodo analitico affidabile per quantificare la sostanza chimica nelle soluzioni di prova con un'efficienza di recupero e un limite di rilevamento noti.

Le informazioni sulla sostanza chimica in esame che possono essere utili per stabilire le condizioni di prova comprendono: formula strutturale, purezza della sostanza, fotostabilità, e stabilità nelle condizioni di esecuzione della prova, pKa, P_{ow} e risultati di una prova di pronta biodegradabilità [cfr. capitoli C.4 (Determinazione della pronta biodegradabilità), C.29 (pronta biodegradabilità — CO_2 in recipienti ermetici) del presente allegato].

VALIDITÀ DELLA PROVA

Perché la prova sia valida, nei gruppi di controllo devono essere soddisfatti i seguenti criteri di prestazione:

— la mortalità degli animali riproduttori (femmine di *Daphnia*) non supera il 20 % alla fine della prova,

— il numero medio dei piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore sopravvissuto alla fine della prova è ≥ 60.Nota: Lo stesso criterio di validità (20 %) può essere utilizzato per la mortalità parentale accidentale e casuale nei controlli nonché in ciascuna delle concentrazioni di prova.

▼M7

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiature

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. Di norma si utilizzano beaker di vetro come recipienti di prova.

Inoltre sono necessarie alcune o tutte le seguenti apparecchiature:

— misuratore di ossigeno (con microelettrodo o altro apparecchio adatto per la misurazione dell'ossigeno disciolto in campioni di volume ridotto),

— apparecchiatura adeguata per il controllo della temperatura,

— pH-metro,

— apparecchiatura per la determinazione della durezza dell'acqua,

— apparecchiatura per la determinazione della concentrazione dei carbonio organico totale (TOC) nell'acqua o per la determinazione della domanda chimica di ossigeno (COD),

— apparecchiatura adeguata per il controllo del regime di illuminazione e la misurazione dell'intensità della luce.

Organismo sperimentale

La specie da utilizzare nella prova è la *Daphnia magna* Straus ([1]).

Di preferenza il clone va identificato tramite determinazione del genotipo. La ricerca (1) ha dimostrato che le prestazioni riproduttive del Clone A (proveniente dall'IRCHA, in Francia) (5), allevato nelle condizioni descritte nel presente metodo di prova, soddisfa costantemente il criterio di validità di una media di ≥ 60 di piccoli vivi per animale riproduttore sopravvissuto. Sono comunque accettabili altri cloni, purché si dimostri che la coltura di *Daphnia* soddisfa i criteri di validità della prova.

All'inizio della prova gli animali devono avere meno di 24 ore di vita e non devono provenire dalla prima nidiata. Devono provenire da una popolazione sana (senza segni di stress quali un alto tasso di mortalità, presenza di maschi e formazione di efippi, ritardo nella produzione della prima nidiata, decolorazione ecc.). Gli animali riproduttori vanno mantenuti in condizioni di coltura (luce, temperatura, mezzo, alimentazione e numero di animali per unità di volume) simili a quelle che verranno utilizzate nella prova. Se il mezzo di coltura per la *Dafnia* da usare nella prova è diverso da quello utilizzato di routine per la coltura di *Dafnia*, è buona prassi prevedere un periodo di acclimatazione prima del test, normalmente di tre settimane (cioè una generazione), per evitare di sottoporre a stress gli animali destinati alla riproduzione.

Mezzo di prova

Si raccomanda di usare per questa prova un mezzo completamente definito: ciò può evitare l'uso di additivi (ad esempio alghe, estratto di terra), che sono difficili da caratterizzare, e dunque aumentare la possibilità di standardizzazione fra vari laboratori. I mezzi M4 (6) e M7 di Elendt (cfr. appendice 2) si sono rivelati adatti a questo scopo. Sono comunque accettabili altri mezzi [es. (7) (8)], purché si dimostri che le prestazioni della coltura di *Daphnia* soddisfano i criteri di validità della prova.

([1]) È possibile usare altre specie di Dafnidi, purché soddisfino adeguatamente i criteri di validità (il criterio di validità relativo alla capacità riproduttiva nei controlli deve essere pertinente per tutte le specie). Se sono utilizzate altre specie di Dafnidi, occorre identificarle chiaramente e motivare la scelta.

▼M7

Se si impiegano mezzi contenenti additivi non ben definiti, occorre descriverli in dettaglio aggiungendo nella relazione informazioni sulla loro composizione, con particolare riferimento al contenuto di carbonio, che potrebbe influire sulla dieta. Si raccomanda di determinare il carbonio organico totale (TOC) e/o la domanda chimica di ossigeno (COD) della preparazione madre dell'additivo organico e di effettuare una stima del contributo dato al TOC/COD del mezzo di prova. Si raccomanda inoltre che i livelli di TOC nel mezzo (cioè prima dell'aggiunta delle alghe) siano inferiori a 2 mg/l (9).

Quando si testano sostanze chimiche contenenti metalli è importante tener conto del fatto che le proprietà del mezzo di prova (ad esempio la durezza e la capacità di chelazione) possono influire sulla tossicità della sostanza chimica in esame. Per questo motivo è consigliabile utilizzare un mezzo la cui composizione sia completamente conosciuta. Attualmente, però, gli unici mezzi di questo tipo noti per essere adatti alla coltura a lungo termine di *Daphnia magna* sono l'M4 e l'M7 di Elendt. Entrambi i mezzi contengono l'agente chelante EDTA. La ricerca ha dimostrato (2) che la «tossicità apparente» del cadmio è generalmente inferiore quando il test sulla riproduzione viene eseguito nei mezzi M4 e M7 invece che in mezzi non contenenti EDTA. I mezzi M4 e M7 non sono pertanto raccomandati per testare sostanze chimiche contenenti metalli; occorre inoltre evitare anche altri mezzi che contengono agenti chelanti. Per le sostanze chimiche contenenti metalli può essere consigliabile utilizzare un mezzo alternativo come ad esempio l'acqua dolce dura ricostituita secondo le indicazioni dell'ASTM (9), che non contiene EDTA. Questa combinazione di acqua dolce dura ricostituita ed estratto di alghe marine è adatta alla coltura a lungo termine (10) di *Daphnia magna* (2).

La concentrazione dell'ossigeno disciolto deve essere superiore a 3 mg/l, all'inizio e durante la prova. Il pH deve collocarsi nell'intervallo 6-9 senza di norma variare di oltre 1,5 unità nell'ambito di una prova. Si raccomanda una durezza superiore a 140 mg/l (come $CaCO_3$). Le prove eseguite con un valore pari o superiore a questo livello hanno dimostrato che le prestazioni riproduttive sono conformi ai criteri di validità (11) (12).

Soluzioni di prova

Le soluzioni di prova alle concentrazioni prescelte vanno in genere preparate per diluizione di una soluzione madre. Se possibile, le soluzioni madre devono essere preparate preferibilmente senza l'impiego di eventuali solventi o disperdenti, mediante miscelazione o agitazione della sostanza chimica in esame nel mezzo di prova utilizzando mezzi meccanici (es. per agitazione, mescolatura, ultrasuoni) o altri metodi appropriati. È preferibile esporre i sistemi di prova alle concentrazioni della sostanza chimica da utilizzare nello studio per tutto il tempo necessario a dimostrare il mantenimento della stabilità delle concentrazioni di esposizione prima dell'introduzione degli organismi di prova. Se una sostanza chimica in esame è difficile da sciogliere in acqua, vanno applicate le procedure descritte nel documento di orientamento dell'OCSE per la manipolazione di sostanze «difficili» (13). Andrebbe evitato l'uso di solventi o disperdenti, ma in alcuni casi può rendersi necessario utilizzarli per ottenere una soluzione madre di adeguata concentrazione per il dosaggio.

Occorre allestire, oltre alle concentrazioni di prova, un campione di controllo con l'acqua di diluizione con adeguate repliche e, se ciò si rivelasse inevitabile, un controllo con solvente con adeguate repliche. Per la prova vanno utilizzati solo i

▼M7

solventi o disperdenti che hanno dimostrato avere effetti minimi o inesistenti sulla variabile di risposta. In (13) sono indicati esempi di solventi (ad esempio l'acetone, l'etanolo, il metanolo, la dimetilformammide e il glicole trietilenico) e di disperdenti adatti (ad esempio il Cremophor RH 40, la metilcellulosa 0,01 % e l'HCO-40). Se si utilizza un solvente, o un disperdente, la sua concentrazione finale non deve superare 0,1 ml/l (13) e deve essere identica in tutti i recipienti sperimentali, salvo che per il campione di controllo con acqua di diluizione. Tuttavia, occorre compiere ogni sforzo per mantenere la concentrazione di solvente al minimo.

PROCEDURA

Condizioni di esposizione

Durata

La durata del test è di 21 giorni.

Carico

Gli esemplari riproduttori vengono mantenuti individualmente, uno per ciascun recipiente di prova, solitamente con 50-100 ml di mezzo per ogni recipiente (per la *Daphnia magna* sono possibili volumi più piccoli, specialmente per dafnidi più piccoli, ad esempio *Ceriodaphnia dubia*), a meno che sia necessario allestire una prova a flusso continuo.

Talvolta, per soddisfare i requisiti della procedura analitica usata per determinare la concentrazione della sostanza chimica in esame, occorre utilizzare un volume maggiore, sebbene sia consentito il raggruppamento delle repliche per l'analisi chimica. Nel caso si utilizzino volumi superiori a 100 ml, potrebbe essere necessario aumentare la razione fornita alla *Daphnia* per assicurare un'adeguata disponibilità del cibo e il rispetto dei criteri di validità.

Animali da esperimento

Per le prove semistatiche occorrono almeno 10 animali, mantenuti singolarmente, per ogni concentrazione di prova e almeno 10 animali, mantenuti singolarmente, nella serie di controllo.

E stato dimostrato che per le prove a flusso continuo è adeguato utilizzare 40 animali suddivisi in quattro gruppi di 10 per ciascuna concentrazione di prova (1). È possibile utilizzare un numero inferiore di organismi sperimentali, ma si raccomanda comunque di utilizzare un minimo di 20 animali per concentrazione, divisi in due o più repliche con un numero uguale di animali (ad esempio quattro repliche con cinque dafnidi ciascuna). Si noti che per le prove nelle quali gli animali sono mantenuti in gruppi, non sarà possibile escludere nessuna prole dall'analisi statistica in caso di mortalità parentale casuale/accidentale in fase di riproduzione già avviata, e pertanto in questi casi la capacità riproduttiva va espressa come numero totale di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore presente all'inizio della prova.

Occorre randomizzare l'assegnazione dei trattamenti ai recipienti di prova e tutte le successive manipolazioni. In caso contrario si potrebbero verificare «bias» che potrebbero essere interpretate come un effetto della concentrazione. In particolare, se le unità sperimentali vengono manipolate in ordine di trattamento o di concentrazione, alcuni effetti collegati al tempo (ad esempio la stanchezza dell'operatore o un altro errore) possono produrre effetti maggiori alle concentrazioni più alte. Inoltre, se si ritiene che i risultati della prova possano essere influenzati da condizioni sperimentali iniziali o ambientali (ad esempio la posizione nel laboratorio), bisogna considerare la possibilità di porre termine alla prova.

Alimentazione

Nelle prove semistatiche è preferibile nutrire gli animali ogni giorno, e comunque almeno tre volte alla settimana (in concomitanza con la sostituzione del mezzo). Occorre tenere conto dell'eventuale diluizione delle concentrazioni di esposizione dovuta all'aggiunta del prodotto alimentare, evitandola, per quanto possibile, grazie a sospensioni ben concentrate di alghe. Se non si osserva questo modello (per esempio nelle prove a flusso continuo) occorre segnalarlo nella relazione.

Durante la prova la dieta degli animali riproduttori deve consistere preferibilmente in alghe unicellulari vive di una o più delle seguenti specie: *Chlorella sp*., *Pseudokirchneriella subcapitata* (in precedenza *Selenastrum capricornutum*) e *Desmodesmus subspicatus* (in precedenza *Scenedesmus subspicatus*). La dieta deve essere basata sulla quantità di carbonio organico (C) fornita a ciascun animale riproduttore. Ricerche (14) hanno dimostrato che per ottenere il numero di piccoli vivi di *Daphnia magna* necessari per soddisfare i criteri di validità

▼M7

sono sufficienti razioni comprese fra 0,1 e 0,2 mg C/*Daphnia*/die. È possibile somministrare la razione in maniera costante per tutto il periodo della prova oppure una razione inferiore all'inizio della prova della prova ed una razione più alta durante la prova, tenendo conto della crescita degli animali riproduttori. In questo caso la razione deve comunque restare sempre nell'intervallo raccomandato di 0,1 — 0,2 mg C/*Daphnia*/die.

Se per comodità (visto che la misurazione del tenore di carbonio richiede molto tempo) si utilizzano altri parametri di misurazione, quali la conta delle cellule algali o l'assorbanza della luce, per somministrare la razione necessaria, ogni laboratorio deve elaborare un proprio nomogramma che correli il parametro di misurazione scelto al contenuto di carbonio della coltura di alghe (cfr. appendice 3 per l'elaborazione del nomogramma). I nomogrammi vanno controllati almeno una volta all'anno e con maggiore frequenza in caso di modifica delle condizioni di coltura delle alghe. È stato dimostrato che per il contenuto di carbonio l'assorbanza della luce è un indicatore migliore che non il numero di cellule (15).

Occorre alimentare le *Daphnia* con una sospensione concentrata di alghe per ridurre al minimo il volume del mezzo di coltura algale trasferito nei recipienti di prova. La concentrazione delle alghe può essere ottenuta per centrifugazione e successiva risospensione nel mezzo di coltura delle *Daphnia*.

Luce

16 ore di luce a un'intensità non superiore a 15 – 20 μE · m^{-2} · s^{-1} misurata sulla superficie dell'acqua del recipiente. Per gli strumenti per la misurazione della luce calibrati in lux, un intervallo equivalente di 1 000-1 500 lux per la luce bianca fredda corrisponde da vicino all'intensità raccomandata della luce, cioè 15 – 20 μE · m-2 · s – 1.

Temperatura

La temperatura del mezzo di prova si colloca nell'intervallo 18-22 °C. Tuttavia, per ogni test la temperatura non deve variare quotidianamente, se possibile, di più di 2 °C all'interno dell'intervallo indicato (ossia, deve mantenersi nei seguenti intervalli: 18-20, 19-21 o 20-22 °C) Per controllare la temperatura si può utilizzare un recipiente di prova aggiuntivo.

Aerazione

I recipienti di prova non vanno aerati durante la prova.

Disegno sperimentale

Prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni

Ove necessario, si effettua una prova per determinare l'intervallo delle concentrazioni (*range finding test*): ad esempio, cinque concentrazioni della sostanza chimica in esame e due repliche per ogni gruppo di trattamento e di controllo. Ulteriori informazioni sulla tossicità acuta per Daphnia e/o per altri organismi acquatici, derivanti da prove con sostanze chimiche simili o tratte dalla letteratura specializzata, possono anche essere utili per decidere l'intervallo di concentrazioni da sottoporre alla prova di determinazione degli intervalli delle concentrazioni.

La durata della prova di determinazione degli intervalli delle concentrazioni è 21 giorni o una durata sufficiente a prevedere in modo attendibile i livelli degli effetti. Al termine della prova viene valutata la capacità riproduttiva della *Daphnia*. Vanno registrati il numero di animali riproduttori e la comparsa di prole.

Prova definitiva

In genere occorrono almeno cinque concentrazioni di prova, soffermandosi sulle concentrazioni efficaci (ad esempio EC_x) e disposte in una serie geometrica con un fattore di separazione preferibilmente non superiore a 3,2. Vanno usate un numero adeguato di repliche per ciascuna concentrazione di prova (cfr. paragrafi 24-25). L'uso di un numero di concentrazioni inferiore a cinque va giustificato. Le sostanze chimiche non vanno provate al di sopra del loro limite di solubilità

▼M7

nel mezzo di prova. Prima di condurre l'esperimento si consiglia di prendere in considerazione la potenza statistica del disegno di prova e l'uso di metodi statistici adeguati (4). Nel definire l'intervallo delle concentrazioni è necessario tenere conto dei seguenti elementi:

i) quando si stima l'EC_x per gli effetti sulla riproduzione, è consigliabile usare un numero sufficiente di concentrazioni tale da consentire di definire l'EC_x con un livello di confidenza adeguato. Idealmente, le concentrazioni di prova utilizzate devono comprendere l'EC_x stimata, in modo tale che quest'ultima possa essere determinata per interpolazione anziché per estrapolazione. L'analisi statistica che segue trae vantaggio dall'utilizzare un numero maggiore di concentrazioni di prova (per esempio 10), un numero minore di repliche di ciascuna concentrazione (per esempio 5, così da mantenere costante il numero totale di recipienti) e 10 controlli.

ii) Se l'obiettivo è ottenere la LOEC e/o la NOEC, la concentrazione di prova più bassa dovrà essere sufficientemente bassa da far sì che la capacità riproduttiva a tale concentrazione non sia significativamente inferiore rispetto a quella del controllo. In caso contrario la prova andrà ripetuta con una concentrazione minima più bassa.

iii) Se l'obiettivo è ottenere la LOEC e/o la NOEC, la concentrazione di prova più alta sarà sufficientemente alta da far sì che la capacità riproduttiva a tale concentrazione sia significativamente inferiore rispetto a quella del controllo. In caso contrario, la prova va ripetuta con una concentrazione massima più elevata, a meno che la concentrazione massima richiesta per stabilire gli effetti cronici (cioè 10 mg/l) sia già stata utilizzata quale concentrazione massima di prova nel saggio iniziale.

Se non si osservano effetti alla concentrazione massima durante la prova di determinazione degli intervalli delle concentrazioni (ad esempio a 10 mg/l), o quando è altamente probabile che la sostanza chimica in esame sia di tossicità scarsa o nulla basandosi sulla tossicità nulla rilevata per altri organismi, e/o quando tali organismi la assorbono poco o per nulla, la prova di riproduzione può essere eseguita come una prova limite, con una concentrazione di prova, ad esempio, di 10 mg/l e un controllo. Occorre utilizzare dieci repliche sia per i gruppi di trattamento sia per i gruppi di controllo. Se la prova limite richiede un sistema a flusso continuo, può essere adeguato utilizzare meno repliche. Una prova limite fornirà l'occasione di dimostrare che non esiste un effetto statisticamente significativo alla concentrazione limite, ma se invece vengono registrati degli effetti sarà in genere necessario procedere a una prova completa.

Controlli

In aggiunta alle concentrazioni con la sostanza chimica in esame, dovrebbe essere allestita una serie di controllo con il mezzo di prova ed eventualmente una serie di controllo contenente il solvente o il disperdente. La concentrazione dell'eventuale solvente o disperdente deve essere identica a quella usata nei recipienti contenenti la sostanza chimica in esame. Anche per i controlli occorre usare un numero adeguato di repliche (cfr. paragrafi 23-24).

Generalmente, in un test ben condotto, il coefficiente di variazione del numero medio di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore nel o nei controlli dovrebbe essere $\leq$ 25 %; il coefficiente di variazione va riportato per le prove dove gli animali riproduttori sono mantenuti individualmente.

Rinnovo del mezzo di prova

La frequenza con cui il mezzo viene rinnovato dipende dalla stabilità della sostanza chimica in esame, ma dovrebbe essere almeno tre volte alla settimana. Se da prove preliminari sulla stabilità (cfr. paragrafo 7) la concentrazione della sostanza chimica in esame non risulta stabile (è cioè al di fuori dell'intervallo 80-120 % della concentrazione nominale o al di sotto dell'80 % della concentrazione iniziale misurata) durante il periodo massimo di rinnovo (tre giorni), si consiglia di rinnovare il mezzo con maggiore frequenza oppure di eseguire una prova a flusso continuo.

▼M7

Quando si rinnova il mezzo nelle prove semistatiche si prepara una seconda serie di recipienti dove vengono trasferiti gli animali riproduttori mediante, ad esempio, una pipetta di vetro di diametro adeguato. Il volume del mezzo trasferito con le *Daphnia* dovrebbe essere il più piccolo possibile.

Osservazioni

I risultati delle osservazioni fatte durante il test vanno registrati su apposite schede di raccolta dei dati (cfr. appendici 4 e 5). Dovendo fornire i dati di altre misurazioni (cfr. paragrafo 44) possono essere richieste ulteriori osservazioni.

Prole

La prole prodotta da ciascun animale riproduttore dovrebbe essere di preferenza tolta dal recipiente e contata ogni giorno a partire dalla comparsa della prima schiusa, per impedire che consumi cibo destinato all'animale riproduttore. Ai fini del metodo di prova qui descritto è necessario contare solo il numero di piccoli vivi, ma è consigliabile registrare anche la presenza di uova abortite o piccoli morti.

Mortalità

La mortalità fra gli animali riproduttori va rilevata di preferenza quotidianamente, o almeno ad ogni conta dei piccoli.

Altri parametri

Sebbene questo metodo di prova sia fondamentalmente inteso a valutare gli effetti sulla capacità riproduttiva, è possibile che altri effetti siano sufficientemente quantificati da permettere un'analisi statistica. È possibile registrare la capacità riproduttiva per animale riproduttore superstite, ossia il numero di piccoli vivi prodotti durante la prova per riproduttore superstite. Ciò può essere confrontato con la principale variabile di risposta (la capacità riproduttiva all'inizio della prova, per animale riproduttore che non sia vittima di morte casuale o accidentale durante la prova). In presenza di mortalità parentale nelle repliche esposte si deve stabilire se essa segue un modello concentrazione-risposta, ad esempio se vi è una significativa regressione della risposta rispetto alla concentrazione della sostanza chimica in esame con una pendenza positiva (è possibile utilizzare una prova statistica quale il test di Cochran-Armitage per le tendenze). Se la mortalità non segue un modello concentrazione-risposta, le repliche che presentano mortalità parentale vanno escluse dall'analisi del risultato della prova. Se la mortalità segue un modello concentrazione-risposta, la mortalità parentale è assimilata a un effetto della sostanza chimica in esame e le repliche non vanno escluse dall'analisi del risultato della prova. La misura della crescita è particolarmente auspicabile in quanto fornisce informazioni su possibili effetti subletali, che potrebbero essere utili e affiancarsi alla sola misura della riproduzione; si raccomanda di misurare la lunghezza degli animali riproduttori (lunghezza del corpo esclusa la spina posteriore del carapace) alla fine del test. Altri parametri che possono essere misurati o calcolati sono: il periodo intercorso fino alla produzione della prima schiusa (e delle schiuse successive), il numero e le dimensioni delle schiuse per animale, il numero delle schiuse abortite, la presenza di maschi neonati (OCSE, 2008) o efippi e possibilmente il tasso intrinseco di aumento della popolazione (cfr. appendice 1 per la definizione e l'appendice 7 per l'identificazione del sesso dei neonati).

Frequenza delle determinazioni e delle misurazioni analitiche

Concentrazione dell'ossigeno, temperatura, durezza e pH dovrebbero essere misurati almeno una volta alla settimana, nei mezzi freschi (dopo il rinnovo) e vecchi (prima del rinnovo), nel/i controllo/i e nella concentrazione massima della sostanza chimica in esame.

Durante la prova le concentrazioni della sostanza chimica in esame vanno determinate a intervalli regolari.

Nelle prove semistatiche in cui si prevede che la concentrazione della sostanza chimica in esame resti intorno a ± 20 % del valore nominale (e cioè entro l'intervallo dell'80-120 %; cfr. paragrafi 6, 7 e 39), si raccomanda di analizzare

▼M7

almeno le concentrazioni minima e massima di prova subito dopo la loro preparazione e in occasione di un rinnovo del mezzo nel corso della prima settimana del test (le analisi vanno effettuate su un campione della stessa soluzione, appena preparata e al momento di rinnovarla). Queste determinazioni vanno poi ripetute a intervalli almeno settimanali.

Per le prove in cui non si prevede che la concentrazione della sostanza in esame resti entro ± 20 % del valore nominale, è necessario analizzare tutte le concentrazioni di prova, appena preparate e al momento di rinnovarle. Tuttavia, per le prove in cui la concentrazione iniziale misurata della sostanza chimica in esame non è entro ± 20 % del valore nominale, ma si può fornire prova che le concentrazioni iniziali sono ripetibili e stabili (cioè entro un range dell'80-120 % delle concentrazioni iniziali), nella seconda e terza settimana della prova le determinazioni chimiche possono limitarsi alle concentrazioni massima e minima. In tutti i casi la determinazione delle concentrazioni della sostanza chimica in esame prima del rinnovo può limitarsi a un unico recipiente per ciascuna concentrazione.

Per le prove a flusso continuo è appropriato l'uso di un regime di campionamento simile a quello descritto per le prove semistatiche (sebbene in questo caso non ci sia la misurazione delle soluzioni «vecchie»). Può essere però consigliabile aumentare il numero di campionamenti durante la prima settimana (ad esempio, tre serie di misurazioni) per accertare la stabilità delle concentrazioni di prova. In questi tipi di prova dovrebbe essere controllato quotidianamente il tasso di flusso del diluente e della sostanza chimica in esame.

Potendo dimostrare che durante l'intera prova la concentrazione della sostanza chimica in esame in soluzione è stata mantenuta in modo soddisfacente entro ± 20 % della concentrazione nominale o della concentrazione iniziale misurata, i risultati possono essere basati sui valori nominali o sui valori iniziali misurati. Se la deviazione dalla concentrazione iniziale nominale o misurata è maggiore del ± 20 %, i risultati vanno espressi in termini di media ponderata nel tempo (v. orientamenti per il calcolo nell'appendice 6).

DATI E RELAZIONI

Trattamento dei risultati

La presente prova è intesa a determinare gli effetti della sostanza chimica in esame sulla capacità riproduttiva. Occorre calcolare il numero complessivo di piccoli vivi per animale riproduttore per ciascun recipiente di prova (replica). Inoltre, la capacità riproduttiva può essere calcolata sulla base della produzione di piccoli vivi per animale riproduttore superstite. Tuttavia, la variabile di risposta ecologicamente più rilevante corrisponde al numero totale di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore che non sia vittima di morte accidentale ([1]) o casuale ([2]) durante la prova. Se l'animale riproduttore muore accidentalmente o casualmente durante il test, o si rivela essere un maschio, la replica viene esclusa dall'analisi. L'analisi si baserà quindi su un numero ridotto di repliche. In presenza di mortalità parentale nelle repliche esposte si deve stabilire se essa segue un modello concentrazione-risposta, ad esempio se vi è una significativa regressione della risposta rispetto alla concentrazione della sostanza chimica in esame con una pendenza positiva (è possibile utilizzare una prova statistica quale il test di Cochran-Armitage per le tendenze). Se la mortalità non segue un modello concentrazione-risposta, le repliche che presentano mortalità parentale vanno escluse dall'analisi del risultato della prova. Se la mortalità segue un modello concentrazione-risposta, la mortalità parentale è assimilata a un effetto della sostanza chimica in esame e le repliche non vanno escluse dall'analisi del risultato della prova.

In sintesi, quando gli effetti sono espressi come LOEC e NOEC o EC_x si raccomanda di calcolare gli effetti sulla riproduzione mediante l'uso delle due variabili di risposta succitate, vale a dire

([1]) Mortalità accidentale: mortalità non legata a sostanze chimiche e causata da un evento accidentale (della quale, cioè, si conosce la causa).

([2]) Mortalità casuale: mortalità non legata a sostanze chimiche e della quale non si conosce la causa.

▼M7

— il numero totale di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore che non sia vittima di morte accidentale o casuale durante la prova;

— il numero di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore superstite;

e di utilizzare in seguito come risultato finale il più basso valore LOEC e NOEC o EC_x calcolato utilizzando queste due variabili di risposta.

Prima di ricorrere all'analisi statistica, ad esempio tramite analisi ANOVA o il confronto dei gruppi trattati e dei gruppi di controllo con i test di Student (test t), di Dunnett, di Williams o di Jonckheere-Terpstra (test di tendenza regressiva), si raccomanda di considerare la trasformazione dei dati se ciò è necessario per soddisfare i requisiti del particolare test statistico. Come alternativa non parametrica, si possono prendere in considerazione i test di Dunn o Mann-Whitney. Per le medie di ciascuna concentrazione sono calcolati intervalli di confidenza al 95 %.

Il numero di animali riproduttori sopravvissuti nei controlli non trattati è un criterio di validità che deve essere documentato e registrato. Anche tutti gli altri effetti negativi, ad esempio comportamenti anomali e risultati tossicologici significativi, devono essere registrati nella relazione finale.

ECx

I valori ECx, e i relativi limiti di confidenza superiori e inferiori, vanno calcolati utilizzando metodi statistici appropriati (funzione logistica o di Weibull, metodo semplificato di Spearman-Karber o semplice interpolazione). Per calcolare la EC10, la EC_{50} o qualsiasi altra ECx, occorre sottoporre la serie completa di dati a un'analisi di regressione.

NOEC/LOEC

Se l'analisi statistica intende determinare la NOEC/LOEC occorre fare uso di metodi statistici appropriati in base al Documento n. 54 dell'OCSE «*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*» (4): In generale, gli effetti nocivi della sostanza chimica in esame rispetto al controllo sono analizzati applicando un'ipotesi unilaterale con $p \leq 0,05$.

La distribuzione normale dei dati e l'omogeneità della varianza possono ad esempio essere analizzate mediante il test di Shapiro-Wilk o il test di Levene ($p \leq 0,05$), rispettivamente. Possono essere eseguiti un'analisi della varianza ANOVA a un fattore e successivi test multi-comparativi. I test multi-comparativi (ad esempio, test di Dunnett) o i test di tendenza regressiva (ad esempio, test di Williams o di Jonckheere-Terpstra) 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 (4)]. Altrimenti, per determinare la LOEC e la NOEC si possono utilizzare metodi non parametrici (test U di Bonferroni secondo il test di tendenza di Holm o di Jonckheere-Terpstra).

Prova limite

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 a un test t per varianze disuguali (es.: test di Welch) o a un test non parametrico, come il test di Wilcoxon-Mann-Whithey.

Per determinare significative divergenze tra i controlli (campione di controllo e controllo con solvente o disperdente), 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 di controllo con solvente. In caso contrario, occorre confrontare tutti i trattamenti con il controllo con solvente.

▼M7

Relazione sulla prova

La relazione sulla prova include le informazioni indicate di seguito.

Sostanza chimica in esame:

— natura fisica e proprietà fisico-chimiche pertinenti,

— dati di identificazione chimica, compresa la purezza.

Specie in esame:

— clone (se è stato tipizzato geneticamente), fornitore o provenienza (se nota) e condizioni di coltura utilizzate. Se si usa una specie diversa dalla *Daphnia magna*, è necessario precisarlo nella relazione e giustificare i motivi di questa scelta.

Condizioni della prova:

— procedura di prova usata (ad esempio semistatica o a flusso continuo, volume, carico espresso in numero di *Daphnia* per litro);

— fotoperiodo e intensità della luce;

— disegno sperimentale (ad esempio, numero di repliche, numero di animali riproduttori per replica);

— particolari sul mezzo di coltura utilizzato;

— eventuali aggiunte di materiale organico, inclusa composizione, fonte, metodo di preparazione, TOC/COD delle preparazioni madri, stima del TOC/COD risultante nel mezzo di prova;

— informazioni dettagliate sull'alimentazione, comprese la quantità (in mg C/*Daphnia*/die) e il programma (ad esempio tipo di alimento/i, compresi il nome della specie di alga e, se noti, il ceppo e le condizioni di coltura);

— metodo di preparazione delle soluzioni madre e frequenza di rinnovo (deve essere specificato il tipo e la concentrazione del solvente o disperdente, se usati).

Risultati:

— risultati di eventuali studi preliminari sulla stabilità della sostanza chimica in esame,

— concentrazioni di prova nominali e risultati di tutte le analisi per determinare la concentrazione della sostanza chimica nei recipienti di prova (cfr. esempi di schede di raccolta dati nell'appendice 5); vanno indicati anche l'efficienza di recupero del metodo e il limite di determinazione;

— qualità dell'acqua nei recipienti di prova (cioè: pH, temperatura e concentrazione dell'ossigeno disciolto, e, dove possibile, anche TOC e/o COD e durezza) (cfr. esempio di scheda di raccolta dati nell'appendice 4);

— numero totale di piccoli vivi prodotti durante la prova da ciascun animale riproduttore (cfr. esempio di scheda di raccolta dati nell'appendice 4);

— numero di decessi fra gli animali riproduttori e giorno in cui sono avvenuti (cfr. esempio di scheda di raccolta dati nell'appendice 4);

— il coefficiente di variazione per la capacità riproduttiva dei controlli (basato sul numero totale di piccoli vivi per animale riproduttore vivo alla fine della prova);

— diagramma del numero totale di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore in ogni replica escludendo qualsiasi animale riproduttore vittima di morte accidentale o casuale nel corso della prova, rispetto alla concentrazione della sostanza chimica in esame;

▼M7

— se del caso, diagramma del numero totale di piccoli vivi prodotti per animale riproduttore superstite in ogni replica, rispetto alla concentrazione della sostanza chimica in esame;

— se del caso, la concentrazione più bassa alla quale si osservano effetti (LOEC) sulla riproduzione, comprese una descrizione delle procedure statistiche utilizzate e un'indicazione dell'entità dell'effetto previsto (per ottenere tale dato è possibile eseguire un'analisi della potenza prima dell'inizio dell'esperimento) e la concentrazione senza effetto (NOEC) sulla riproduzione; informazioni sulla variabile di risposta utilizzata per il calcolo dei valori di LOEC e NOEC (come totale di piccoli vivi per organismo materno non vittima di morte accidentale o casuale nel corso della prova o come numero totale di piccoli vivi per organismo materno superstite), ove opportuno occorre registrare la LOEC o la NOEC relativa alla mortalità degli animali riproduttori;

— se del caso, la EC_x per la riproduzione e gli intervalli di confidenza (es. 90 % o 95 %), nonché un grafico del modello adeguato utilizzato per il loro calcolo, la pendenza della curva dose-risposta e il suo errore standard;

— altri effetti biologici osservati o misurati: registrare qualsiasi altro effetto biologico osservato o misurato (es. crescita degli animali riproduttori) comprese, se del caso, le giustificazioni pertinenti;

— spiegazione di eventuali deviazioni dal metodo di prova.

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 marzo 1993.

(2) OECD (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Parigi.

(3) OECD (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No. 88. OECD, Parigi.

(4) OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Parigi.

(5) Baird, D.J., *et al*. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. Ecotox. and Environ. Safety, 21, 257-265.

(6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

(7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods

(8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, 775-782.

(9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. In: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 — 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA

(10) Baird, D.J., *et al*. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.

▼M7

(11) Parkhurst, B.R., J.L Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1-8.

(12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120 (2): 185-196.

(13) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Parigi.

(14) Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993) Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053-2058.

(15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.

▼M7

Appendice 1

DEFINIZIONI

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

Mortalità accidentale: mortalità non collegata a sostanze chimiche e causata da un evento accidentale (cioè da una causa conosciuta).

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

EC_x: concentrazione della sostanza chimica in esame disciolta in acqua che provoca una percentuale x di riduzione della capacità riproduttiva della *Daphnia magna* entro un determinato periodo di esposizione.

Mortalità casuale: mortalità non collegata a sostanze chimiche e priva di causa conosciuta.

Tasso intrinseco di aumento della popolazione: misura della crescita della popolazione che integra la capacità riproduttiva e la mortalità specifica in base all'età (1) (2) (3). Nelle popolazioni in equilibrio dinamico è uguale a zero. Per le popolazioni in crescita è positivo, mentre per quelle in diminuzione è negativo. Ovviamente, quest'ultimo tasso non è sostenibile e, alla fine, porta all'estinzione.

Limite di rilevazione: concentrazione minima che può essere individuata ma non quantificata.

Limite di determinazione: concentrazione minima misurabile quantitativamente.

Minima concentrazione con effetti significativi (*Lowest Observed Effect Concentration* — LOEC): la concentrazione più bassa sottoposta a prova alla quale si osserva che la sostanza chimica produce un effetto statisticamente significativo sulla riproduzione e sulla mortalità parentale (con $p < 0,05$) rispetto ai controlli, entro un periodo di esposizione definito. Tuttavia, tutte le concentrazioni di prova superiori alla LOEC devono avere un effetto dannoso uguale o superiore a quelli osservati alla LOEC. Se non è possibile soddisfare queste due condizioni, è necessario fornire una spiegazione esauriente sulle modalità di scelta della LOEC (e di conseguenza della NOEC).

Mortalità: si considerano morti gli animali che, entro 15 secondi dopo lieve agitazione del contenitore usato per la prova, restano immobili, cioè non sono in grado di nuotare, o nei quali non si osserva alcun movimento delle appendici o della parte posteriore dell'addome. (Nel caso si usi un'altra definizione, essa deve essere indicata insieme al relativo riferimento bibliografico).

Massima concentrazione senza effetti significativi (No Observed Effect Concentration — NOEC): concentrazione di prova immediatamente inferiore alla LOEC che, se confrontata con i controlli, non ha un effetto statisticamente significativo (con $p < 0,05$), entro un periodo di esposizione definito.

Prole: piccoli di *Daphnia* generati dagli animali riproduttori nel corso della prova.

Animali riproduttori: femmine di *Daphnia* presenti all'inizio della prova la cui capacità riproduttiva è oggetto dello studio.

Capacità riproduttiva: numero di piccoli vivi prodotti da animali riproduttori entro il periodo di prova.

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

BIBLIOGRAFIA

(1) Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

▼M7

(2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.

(3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

▼M7

Appendice 2

PREPARAZIONE DEI MEZZI M7 E M4 DI ELENDT TOTALMENTE DEFINITI

Acclimatazione ai mezzi M7 e M4 di Elendt

Alcuni laboratori hanno avuto difficoltà nel trasferire direttamente le *Daphnia* nei mezzi M4 (1) e M7. Qualche risultato soddisfacente è stato invece ottenuto con un'acclimatazione graduale, cioè trasferendo le *Daphnia* dal proprio mezzo ad un mezzo Elendt al 30 %, poi al 60 % e infine ad un mezzo Elendt al 100 %. I periodi di acclimatazione possono avere anche una durata di un mese.

Preparazione

Oligoelementi

Inizialmente si preparano soluzioni madre distinte (I) dei singoli oligoelementi in acqua di adeguata purezza, ad esempio deionizzata, distillata o sottoposta a osmosi inversa. Da queste diverse soluzioni madre (I) si prepara una seconda soluzione madre singola (II) che contiene tutti gli oligoelementi (soluzione combinata), e cioè:

Soluzione/i madre I (sostanza unica)	Quantità aggiunta ad acqua	Concentrazione (rispetto al mezzo M4) (volte)	Quantità di soluzione madre aggiunta per preparare il mezzo ml/l	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
H3BO3	57 190	20 000	1,0	0,25
MnCl2 · 4 H2O	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
SrCl2 · 6 H2O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Mo Na2O4 · 2 H2O	1 260	20 000	1,0	0,25
CuCl2 · 2 H2O	335	20 000	1,0	0,25
ZnCl2	260	20 000	1,0	1,0
CoCl2 · 6 H2O	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na2SeO3	43,8	20 000	1,0	1,0
NH4VO3	11,5	20 000	1,0	1,0
Na2EDTA · 2 H2O	5 000	2 000	—	—
FeSO4 · 7 H2O	1 991	2 000	—	—

Sia la soluzione Na_2EDTA che la $FeSO_4$ vengono preparate singolarmente, versate insieme e inserite immediatamente nell'autoclave. Con ciò si ottiene:

Soluzione Fe-EDTA		1 000	20,0	5,0

▼**M7**

Mezzi M4 e M7

I mezzi di coltura M4 ed M7 sono preparati usando la soluzione madre II, i macronutrienti e le vitamine, nel modo seguente:

	Quantità aggiunta ad acqua	Concentrazione (rispetto al mezzo M4) (volte)	Quantità di soluzione di riserva aggiunto per preparare il mezzo di coltura	
	mg/l		ml/l	
			M 4	M 7
Soluzione madre II (elementi in tracce combinati)		20 volte	50	50
Soluzioni madre con macronutrienti (sostanza unica)				
CuCl2 · 2 H2O	293 800	1 000	1,0	1,0
MgSO4 · 7 H2O	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
NaHCO3	64 800	1 000	1,0	1,0
Na2SiO3 · 9 H2O	50 000	5 000	0,2	0,2
NaNO3	2 740	10 000	0,1	0,1
KH2PO4	1 430	10 000	0,1	0,1
K2HPO4	1 840	10 000	0,1	0,1
Soluzione madre combinata di vitamine	-	10 000	0,1	0,1

La soluzione madre combinata di vitamine si prepara aggiungendo le 3 vitamine a 1 litro di acqua, come segue:

	mg/l			
Cloridrato di tiammina	750	10 000		
Cianocobalamina (B_{12})	10	10 000		
Biotina	7,5	10 000		

La soluzione madre combinata di vitamine si conserva congelata in piccole aliquote. Le vitamine si aggiungono al mezzo di coltura poco prima dell'uso.

N.B.: per evitare la precipitazione dei sali durante la preparazione dei mezzi completi, aggiungere le aliquote delle soluzioni madre a circa 500-800 ml di acqua deionizzata e poi portare a 1 litro.

N.N.B. Il primo studio pubblicato sul mezzo M4 si trova in Elendt, B. P. (1990). *Selenium deficiency in Crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in* Daphnia magna *Straus*. *Protoplasma*, 154, 25-33.

▼M7

Appendice 3

ANALISI DEL CARBONIO ORGANICO TOTALE (TOC) E PRODUZIONE DI UN NOMOGRAMMA PER IL CONTENUTO DI TOC DELL'ALIMENTO ALGALE

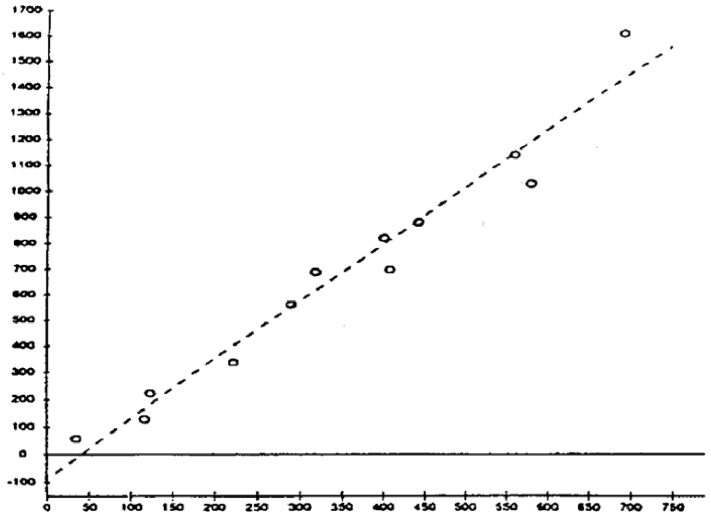
È riconosciuto che il contenuto di carbonio dell'alimento algale non viene di norma misurato direttamente, bensì mediante correlazioni (cioè nomogrammi) con misure sostitutive quali il numero di cellule algali o l'assorbanza della luce.

Il TOC dovrebbe essere misurato per ossidazione ad alta temperatura piuttosto che mediante UV o metodi con persolfati. (Per suggerimenti cfr.: *The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands* 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Per la produzione del nomogramma, le alghe vanno separate dal mezzo di crescita mediante centrifugazione, seguita da risospensione in acqua distillata. Occorre misurare il parametro surrogato e la concentrazione del TOC in ciascun campione in triplicato. Vanno analizzati i bianchi di acqua distillata e la loro concentrazione di TOC viene dedotta dalla concentrazione del TOC nel campione di alghe.

I nomogrammi devono essere lineari nell'intervallo richiesto di concentrazioni del carbonio. Di seguito sono riportati alcuni esempi.

N.B.: non usare questi nomogrammi per effettuare conversioni; è essenziale che ogni laboratorio prepari il suo nomogramma.



Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

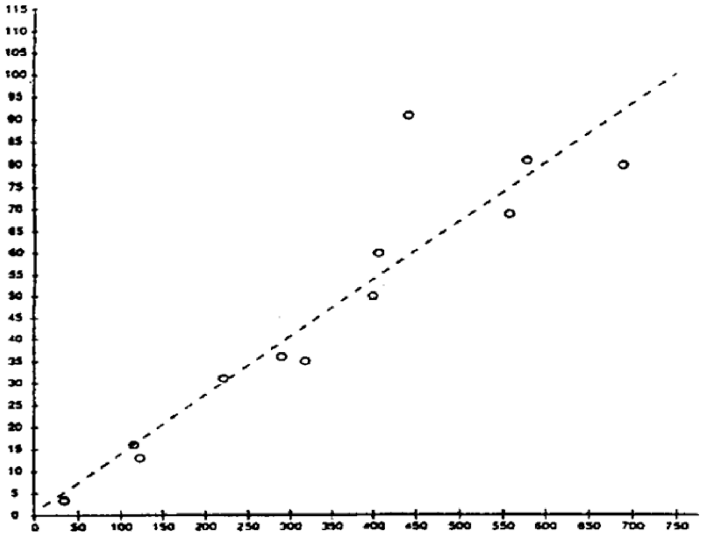
Regressione di mg/l di peso secco su mg C/1. Dati da sospensioni concentrate di cellule in coltura in semicontinuo, risospese in acqua distillata.

Asse x: mg C/1 di alimento algale concentrato

Asse y: mg/1 peso secco di alimento algale concentrato

Coefficiente correttore -0,980

▼**M7**



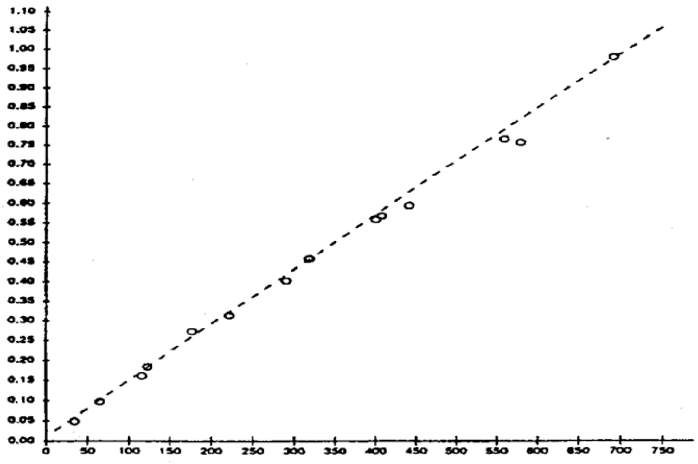
Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regressione del numero di cellule su mg C/1. Dati da sospensioni concentrate di cellule in coltura in semicontinuo, risospese in acqua distillata.

Asse x: mg C/1 di alimento algale concentrato

Asse y: n. di cellule/1 di alimento algale concentrato

Coefficiente correttore -0,926



Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regressione dell'assorbanza su mg C/1 (1 cm di cammino ottico). Dati da sospensioni concentrate di cellule in coltura in semicontinuo, risospese in acqua distillata.

Asse x: mg C/1 di alimento algale concentrato

Asse y: Assorbanza a 440 nm di una diluizione 1/10 di alimento algale concentrato

Coefficiente correttore – 0,998

▼M7

Appendice 4

ESEMPIO DI SCHEDA PER LA RACCOLTA DI DATI SUL RINNOVO DEL MEZZO, IL MONITORAGGIO FISICO/CHIMICO, L'ALIMENTAZIONE, LA RIPRODUZIONE DELLE *DAPHNIA* E LA MORTALITÀ PARENTALE

Esperimento n.:	Data di inizio:						Clone:			Mezzo:				Tipo di alimentazione:				Sostanza chimica in esame:					Concentrazione nominale:	
Giorno	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Rinnovo del mezzo (spuntare)																								
pH (*)																							nuovo	
																							vecchio	
O_2 (mg/l) (*)																							nuovo	
																							vecchio	
Temp (°C) (*)																							nuovo	
																							vecchio	
Somministrazione del cibo (spuntare)																								
Numero di piccoli vivi (**)																								Totale
Recipiente 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

02008R0440 — IT — 08.01.2026 — 011.001 — 1007

▼M7

Esperimento n.:	Data di inizio:						Clone:			Mezzo:				Tipo di alimentazione:				Sostanza chimica in esame:					Concentrazione nominale:	
Giorno	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Totale	
Mortalità parentale comulativa (***)																								

(*) Indicare quale recipiente è stato usato per l'esperimento
(**) Registrare le schiuse abortite inserendo la sigla «AB» (*aborted broods*) nella casella corrispondente.
(***) Registrare la mortalità di ogni animale riproduttore (usando l'iniziale «M») nella casella corrispondente.

02008R0440 — IT — 08.01.2026 — 011.001 — 1008

▼M7

Appendice 5

ESEMPIO DI SCHEDA PER LA REGISTRAZIONE DEI RISULTATI DELLE ANALISI CHIMICHE

(a) **Concentrazioni misurate**

Concentrazioni nominali	Campione settimana 1		Campione settimana 2		Campione settimana 3	
	Fresco	Vecchio	Fresco	Vecchio	Fresco	Vecchio

(b) **Concentrazioni misurate come percentuale del valore nominale**

Concentrazioni nominali	Campione settimana 1		Campione settimana 2		Campione settimana 3	
	Fresco	Vecchio	Fresco	Vecchio	Fresco	Vecchio

▼M7

Appendice 6

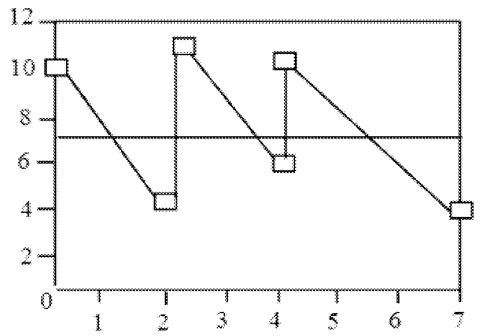
CALCOLO DI UNA MEDIA PONDERATA NEL TEMPO

Media ponderata nel tempo

Dato che la concentrazione della sostanza chimica in esame può diminuire nel periodo fra i rinnovi del mezzo è necessario considerare quale concentrazione vada scelta come rappresentativa dell'intervallo di concentrazioni a cui sono state esposte le *Daphnia* riproduttrici. La selezione deve basarsi su considerazioni biologiche oltre che statistiche. Per esempio, se si ritiene che la riproduzione venga influenzata soprattutto dalla concentrazione picco, si deve utilizzare la concentrazione massima. Se invece si ritiene più importante l'effetto accumulato o a più lungo termine della sostanza chimica tossica, allora risulta più pertinente una concentrazione media. In questo caso una media adeguata è la concentrazione media ponderata nel tempo, in quanto tiene conto della variazione della concentrazione istantanea nel corso del tempo.

Figura 1

Esempio di media ponderata in funzione tempo



La Figura 1 mostra un esempio di test (semplificato) della durata di sette giorni con rinnovo del mezzo nei giorni 0, 2 e 4.

— La linea sottile a zig-zag rappresenta la concentrazione in qualsiasi momento nel tempo. Si suppone che la caduta della concentrazione segua un processo di decadimento esponenziale.

— I sei quadratini rappresentano le concentrazioni osservate misurate all'inizio e alla fine di ciascun periodo di rinnovo.

— La linea retta spessa indica la posizione della media ponderata nel tempo.

La media ponderata nel tempo viene calcolata in modo che l'area ad essa sottostante sia uguale all'area sotto la curva della concentrazione. Il calcolo per l'esempio in figura è illustrato nella tabella 1.

Tabella 1

Calcolo di una media ponderata nel tempo

Rinnovo n.	Giorni	Conc0	Conc1	Ln(Conc0)	Ln(Conc1)	Area
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781

▼M7

Rinnovo n.	Giorni	Conc0	Conc1	Ln(Conc0)	Ln(Conc1)	Area
Giorni totali:	7				Area totale:	50,092
					Media ponderata/t:	7,156

Giorni è il numero di giorni nel periodo di rinnovo.

Conc0 è la concentrazione misurata all'inizio di ciascun periodo di rinnovo.

Conc1 è la concentrazione misurata alla fine di ciascun periodo di rinnovo.

Ln(Conc0) è il logaritmo naturale di Conc0.

Ln(Conc1) è il logaritmo naturale di Conc1.

Area è l'area sotto la curva esponenziale per ciascun periodo di rinnovamento. Viene calcolata nel modo seguente:

$$Area = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times Day$$

La media ponderata nel tempo (*media ponderata/t*) è l'*Area totale* divisa per i *Giorni totali*.

Ovviamente per la prova di riproduzione con *Daphnia* occorre prolungare la tabella fino a coprire 21 giorni.

È chiaro che quando le osservazioni vengono effettuate solo all'inizio e alla fine di ciascun periodo di rinnovamento non è possibile confermare che il processo di decadimento è effettivamente esponenziale. Una curva diversa produrrebbe un calcolo diverso per l'*Area*. Tuttavia, è tuttavia plausibile che un processo di decadimento sia esponenziale e questa è probabilmente la curva migliore da usare in assenza di altre informazioni.

Occorre però procedere con cautela se l'analisi chimica non rileva alcuna sostanza alla fine del periodo di rinnovo. A meno che non sia possibile stimare la rapidità con cui la sostanza chimica è scomparsa dalla soluzione, è impossibile ottenere un'area sotto la curva che sia realistica, e pertanto è impossibile ottenere una ragionevole media ponderata nel tempo.

▼M7

Appendice 7

ORIENTAMENTI PER L'IDENTIFICAZIONE DEL SESSO DEI NEONATI

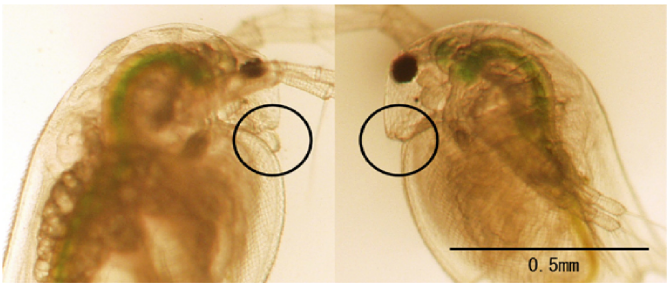
La produzione di neonati di sesso maschile può avvenire modificando le condizioni ambientali, ad esempio abbreviando i fotoperiodi, modificando la temperatura, riducendo la concentrazione degli alimenti e aumentando la densità demografica (Hobaek e Larson, 1990; Kleiven *et al*., 1992). La produzione di neonati di sesso maschile è anche una risposta nota ad alcuni regolatori della crescita degli insetti (Oda *et al.*, 2005). In condizioni in cui agenti chimici stressanti inducono una diminuzione della prole da femmine partenogenetiche, si può prevedere un incremento del numero dei maschi (OCSE, 2008). Sulla base delle informazioni disponibili non è possibile prevedere quale parametro, sia esso il rapporto numerico tra i sessi o la riproduzione, sarà quello più sensibile; tuttavia, vi sono indicazioni (cfr. «relazione di validazione», parte 1) secondo cui questo aumento del numero dei maschi sarebbe meno sensibile della diminuzione dei piccoli vivi. Dato che l'obiettivo primario del presente metodo di prova è valutare il numero di piccoli vivi prodotti, l'osservazione della comparsa di maschi va considerata come facoltativa. Se in uno studio si decide di valutare questo endpoint facoltativo, occorre allora introdurre un ulteriore criterio di validità della prova utilizzando non oltre il 5 % di maschi nei controlli.

Il modo più veloce e semplice per differenziare il sesso delle *Daphnia* consiste nell'utilizzare le loro caratteristiche fenotipiche, in quanto maschi e femmine sono geneticamente identici e il sesso è determinato dalle condizioni ambientali. I maschi e le femmine sono diversi per la lunghezza e la morfologia delle prime antenne, più lunghe nei maschi che nelle femmine (fig. 1). Tale differenza è riconoscibile subito dopo la nascita, sebbene lo sviluppo di caratteristiche sessuali secondarie avvenga con la crescita (cfr., ad esempio, fig. 2 in Olmstead e LeBlanc, 2000).

Per osservare le caratteristiche sessuali morfologiche, i neonati prodotti da ciascun animale sperimentale devono essere trasferiti tramite una pipetta e inseriti in una capsula Petri con mezzo di prova. Il mezzo di prova è mantenuto al minimo per limitare il movimento degli animali. È possibile osservare le prime antenne con un microscopio stereoscopico (× 10-60).

Fig. 1

Esemplari di *Daphna magna* di 24 ore: maschio (sinistra) e femmina (destra). I maschi si distinguono dalle femmine per la lunghezza e la morfologia delle prime antenne, evidenziate nelle cerchiature (Tatarazako *et al.*, 2004).



RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Hobaek A e Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., e Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168-1174.

▼**M7**

OECD, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Number 88. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 19:2107-2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Environmental Science 17, 439-449.

▼B

C.21. MICRORGANISMI DEL SUOLO: TEST DI TRASFORMAZIONE DELL'AZOTO

1. METODO

Questo metodo di prova corrisponde al TG 216 (2000) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Qui di seguito è descritto un metodo di laboratorio messo a punto per studiare gli effetti a lungo termine delle sostanze chimiche, dopo un'unica esposizione, sull'attività di trasformazione dell'azoto ad opera dei microrganismi del suolo. Il test si basa principalmente sulle raccomandazioni dell'Organizzazione europea e mediterranea per la protezione delle piante (1), ma tiene conto anche delle linee guida formulate dal Centro federale tedesco di ricerca biologica per l'agricoltura e la silvicoltura *(Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft)* (2), dall'Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti *(Environmental Protection Agency)* (3), dal SETAC (4) e dall'Organizzazione internazionale di normalizzazione (ISO) (5). Il numero ed il tipo di suoli da utilizzare nel test sono stati concordati in occasione di un *workshop* dell'OCSE sulla selezione dei suoli e dei sedimenti, svoltosi a Belgirate nel 1995 (6). Le raccomandazioni riguardanti il prelievo, la manipolazione e lo stoccaggio dei campioni di suolo si basano su linee guida ISO (7) e sulle raccomandazioni formulate dal *workshop* di Belgirate. Per accertare e valutare le caratteristiche tossiche delle sostanze di prova può essere necessario determinarne gli effetti sull'attività microbica del suolo, ad esempio quando occorre disporre di dati sui potenziali effetti collaterali dei prodotti fitosanitari sulla microflora del suolo o quando si prevede un'esposizione dei microrganismi del suolo ad altri tipi di sostanze chimiche. Il test di trasformazione dell'azoto viene effettuato per determinare gli effetti di queste sostanze chimiche sulla microflora del suolo. Qualora siano testati prodotti agrochimici (ad es. fitosanitari, fertilizzanti, prodotti chimici per la silvicoltura), oltre al test di trasformazione dell'azoto si effettua anche il test di trasformazione del carbonio. Per le altre sostanze chimiche è invece sufficiente il test di trasformazione dell'azoto. Tuttavia se i valori CE_{50} riscontrati per queste sostanze nel test di trasformazione dell'azoto corrispondono a quelli degli inibitori della nitrificazione disponibili in commercio (ad es. nitrapirina), per ottenere maggiori informazioni può essere effettuato anche il test di trasformazione del carbonio.

I suoli sono costituiti da miscele eterogenee e complesse di componenti viventi e non viventi. I microrganismi svolgono un ruolo importante nella decomposizione e nella trasformazione della materia organica in suolo fertile, contribuendo in maniera differente a seconda delle specie ai vari aspetti della fertilizzazione. Eventuali interferenze con questi processi biochimici rischiano a lungo termine di influenzare il ciclo delle sostanze nutritive e di alterare la fertilità del suolo. La trasformazione del carbonio e dell'azoto avviene in tutti i suoli fertili; anche se le comunità microbiche responsabili di questi processi variano a seconda del tipo di suolo, le vie di trasformazione sono sostanzialmente le stesse.

Il metodo di prova di seguito descritto è stato concepito per individuare gli effetti nocivi a lungo termine di una sostanza sul processo di trasformazione dell'azoto nei suoli aerobici superficiali, ma consente anche di stimarne gli effetti sulla trasformazione del carbonio ad opera della microflora del suolo. La formazione di nitrati avviene in seguito alla degradazione del legame carbonio-azoto; di conseguenza, qualora nei campioni di suolo trattato ed in quelli di controllo si riscontrino gli stessi tassi di produzione di nitrati, è molto probabile che le principali vie di degradazione del carbonio siano intatte e funzionali. Il substrato scelto per il test (farina di erba medica in polvere) presenta un buon rapporto carbonio/azoto (compreso normalmente tra 12:1 e 16:1). Per questo motivo durante il test la carenza di carbonio è ridotta e le comunità microbiche eventualmente danneggiate da una sostanza chimica possono ristabilirsi entro 100 giorni.

▼B

I test su cui si basa questo metodo di prova sono stati originariamente concepiti per sostanze di cui è possibile stimare la quantità che penetra nel suolo. È il caso, ad esempio, dei prodotti fitosanitari, la cui dose di applicazione nel terreno è conosciuta. Per i prodotti agrochimici è sufficiente utilizzare due concentrazioni di prova, corrispondenti alla dose di applicazione prevista o stimata; tali prodotti possono essere testati come ingredienti attivi (i.a.) o come prodotti formulati. Tuttavia, cambiando sia la quantità della sostanza di prova applicata al suolo sia le modalità di valutazione dei dati il test può essere utilizzato non soltanto per i prodotti agrochimici ma anche per altre sostanze chimiche di cui non si conosca la quantità che penetra nel suolo; in questo caso è possibile determinare gli effetti sulla trasformazione dell'azoto di una serie di concentrazioni. I dati ottenuti sono utilizzati per costruire una curva dose-risposta e calcolare i valori CE_x, dove x è la percentuale di effetto.

1.2 DEFINIZIONI

Trasformazione dell'azoto: degradazione ad opera dei microrganismi di materia organica contenente azoto attraverso il processo di ammonificazione e nitrificazione, con formazione del relativo prodotto finale inorganico, il nitrato.

CE_x (concentrazione efficace): concentrazione della sostanza di prova nel suolo che determina un'inibizione dell'x per cento nella trasformazione dell'azoto in nitrato.

CE_{50} (concentrazione efficace media): concentrazione della sostanza di prova nel suolo che determina un'inibizione del 50 % nella trasformazione dell'azoto in nitrato.

1.3 SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4 PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA

Dopo essere stato setacciato il suolo viene ammendato con farine vegetali in polvere ed una parte viene trattata con la sostanza di prova mentre un'altra parte non viene sottoposta ad alcun trattamento (controllo). Se il test è effettuato su prodotti agrochimici, si raccomanda di utilizzare almeno due concentrazioni di prova, scelte in relazione alla massima concentrazione prevista nel terreno. Dopo 0, 7, 14 e 28 giorni di incubazione si utilizza un solvente adeguato per estrarre i campioni trattati e i campioni controllo e si determinano le quantità di nitrati presenti negli estratti. La velocità di formazione dei nitrati nei campioni trattati viene comparata con quella dei campioni di controllo, calcolando la percentuale di scarto tra campione trattato e campione controllo. Tutti i test durano almeno 28 giorni. Se al ventottesimo giorno le differenze tra i campioni di suolo trattati e non trattati sono uguali o superiori al 25 % le misurazioni continuano fino ad un massimo di 100 giorni. Se il test è effettuato su prodotti non agrochimici ai campioni di suolo viene aggiunta la sostanza di prova in diverse concentrazioni e dopo 28 giorni di incubazione vengono misurate le quantità di nitrati formate nei campioni trattati ed in quelli di controllo. I risultati dei test effettuati con concentrazioni multiple sono analizzati mediante un modello di regressione ed infine vengono calcolati i valori CE_x (CE_{50}, CE_{25} e/o CE_{10}. Cfr. in proposito le definizioni).

1.5 VALIDITÀ DEL TEST

Le analisi dei risultati del test sui prodotti agrochimici si basano su differenze relativamente modeste (valore medio ± 25 %) tra le concentrazioni di nitrati presenti nei campioni controllo e in quelli trattati, e dunque la presenza di forti variazioni tra i campioni controllo può portare a falsi risultati. Pertanto la variazione tra le diverse repliche dei campioni controllo deve essere inferiore a ± 15 %.

▼B

1.6 DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

1.6.1 **Apparecchiatura**

Per il test sono utilizzati contenitori di materiale chimicamente inerte, di capacità adeguata al metodo di incubazione del suolo utilizzato (ad es. in un campione globale o in una serie di sottocampioni: cfr. paragrafo 1.7.1.2). Occorre adottare le precauzioni necessarie per ridurre al minimo l'evaporazione di acqua e consentire lo scambio di gas durante il test (ad es. i contenitori utilizzati per il test possono essere coperti con un foglio di polietilene perforato). Per i test su sostanze volatili devono essere utilizzati contenitori a chiusura ermetica e a tenuta di gas, di dimensioni tali che il campione di suolo occupi all'incirca un quarto del volume.

Si utilizza attrezzatura da laboratorio di uso comune tra cui:

— agitatore: agitatore meccanico o dispositivo equivalente;

— centrifuga (3 000 g) o sistema filtrante (con carta da filtro priva di nitrati);

— strumento di sensibilità e riproducibilità adeguata per l'analisi dei nitrati.

1.6.2 **Selezione e numero di suoli**

Si utilizza un unico suolo, per il quale si raccomandano le seguenti caratteristiche:

— contenuto in sabbia: non inferiore al 50 % e non superiore al 75 %;

— pH: 5,5-7,5;

— contenuto di carbonio organico: 0,5-1,5 %;

— deve essere misurata la biomassa microbica (8)(9): il contenuto di carbonio di quest'ultima deve corrispondere almeno all'1 % del carbonio organico totale del suolo.

Nella maggior parte dei casi un suolo con queste caratteristiche rappresenta l'ipotesi più sfavorevole, in quanto l'adsorbimento della sostanza chimica di prova è minimo, mentre la disponibilità per la microflora è massima e dunque in genere non è necessario effettuare il test con altri suoli. Tuttavia in alcune circostanze, ad esempio quando si prevede un uso prevalente della sostanza di prova su particolari tipi di suolo, (ad es. suoli forestali acidi) o per sostanze chimiche con carica elettrostatica, può essere necessario utilizzare un suolo aggiuntivo.

▼B

1.6.3 **Prelievo e stoccaggio dei campioni di suolo**

1.6.3.1 *Prelievo*

Devono essere disponibili informazioni dettagliate sulla storia del sito di campionamento, tra cui l'esatta ubicazione, il tipo di copertura vegetale, le date dei trattamenti con prodotti fitosanitari e con fertilizzanti organici o inorganici, l'eventuale applicazione di materiali biologici ed i casi di contaminazione accidentale. Il sito scelto per il prelievo del suolo deve consentire cicli molto lunghi; sono perciò adatti i pascoli permanenti, i terreni destinati a colture cerealicole annuali (ad eccezione del granturco) o da sovescio a semina fitta. Il sito di campionamento scelto non deve essere stato sottoposto a trattamenti con prodotti fitosanitari da almeno un anno e da almeno sei mesi non devono essere stati applicati fertilizzanti organici. L'uso di fertilizzanti minerali è ammesso solo se richiesto dal tipo di coltura in atto ed in questo caso il prelievo di campioni di suolo deve essere effettuato almeno tre mesi dopo l'applicazione del fertilizzante. Bisogna evitare di utilizzare suoli trattati con fertilizzanti di cui siano noti gli effetti biocidi (ad es. calciocianammide).

Il prelievo di campioni non deve avvenire durante o subito dopo lunghi periodi (> 30 giorni) di siccità o di saturazione idrica del terreno. Nei suoli arati i campioni devono essere prelevati ad una profondità compresa tra 0 e 20 cm. Nei suoli a prato o a pascolo o in altri suoli che non vengono arati per lunghi periodi (almeno un ciclo vegetativo) la profondità massima di campionamento può essere leggermente superiore a 20 cm (ad es. fino a 25 cm).

I campioni devono essere trasportati in contenitori adeguati e in condizioni di temperatura tali da garantire che le proprietà iniziali del suolo non vengano alterate in maniera significativa.

1.6.3.2 *Stoccaggio*

È preferibile utilizzare suoli appena prelevati dal terreno. Qualora non si possa evitare lo stoccaggio in laboratorio, i suoli possono essere conservati al buio ad una temperatura di 4 ± 2 °C per un massimo di tre mesi. Durante lo stoccaggio deve essere assicurato il mantenimento in condizioni aerobiche. Se i suoli vengono prelevati da zone in cui gelano per almeno tre mesi l'anno, si può prendere in considerazione lo stoccaggio per sei mesi ad una temperatura compresa tra - 18 °C e - 22 °C. Prima di ogni esperimento viene misurata la biomassa microbica dei suoli: il carbonio presente nella biomassa deve essere pari almeno all'1 % del contenuto di carbonio organico totale nel suolo (cfr. paragrafo 1.6.2).

1.6.4 **Manipolazione e preparazione del suolo**

1.6.4.1 *Pre-incubazione*

Se il suolo è stato stoccato (cfr. paragrafo 1.6.3.2), si raccomanda la pre-incubazione per un periodo compreso tra 2 e 28 giorni. Durante la pre-incubazione la temperatura e il contenuto di umidità del suolo devono essere analoghi a quelli del test (cfr. paragrafi 1.6.4.2 e 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2 *Caratteristiche fisico-chimiche*

Dopo la rimozione manuale di particelle di grandi dimensioni (ad es. sassi, parti di piante, ecc.) il suolo viene setacciato ad umido, evitando l'eccessiva essiccazione, in modo tale che la dimensione dei granuli sia inferiore o uguale a 2 mm. Il contenuto di umidità del campione di suolo deve essere regolato con acqua distillata o deionizzata ad un valore compreso tra il 40 % ed il 60 % della capacità massima di ritenzione idrica.

1.6.4.3 *Ammendamento con substrato organico*

Il suolo deve essere ammendato con idoneo substrato organico, ad es. farina di erba medica verde in polvere (componente principale: *Medicago sativa)* con un rapporto carbonio-azoto (C/N) compreso tra 12:1 e 16:1. Si raccomanda una proporzione di 5 g di erba medica per ogni chilogrammo di terreno (peso secco).

1.6.5 **Preparazione della sostanza di prova per l'applicazione al suolo**

Normalmente la sostanza di prova è applicata utilizzando un vettore, che può essere l'acqua (per le sostanze idrosolubili) o un solido inerte come la sabbia di quarzo fine (diametro: 0,1-0,5 mm). Si deve evitare l'uso di vettori liquidi diversi dall'acqua (ad es. solventi organici come l'acetone o il cloroformio) in quanto possono danneggiare la microflora. Se il vettore utilizzato è la sabbia, quest'ultima può essere rivestita con la sostanza di prova, disciolta o posta in sospensione in un solvente adeguato. In questi casi il solvente deve essere eliminato per evaporazione prima della miscelazione con il suolo. Per consentire una distribuzione ottimale della sostanza di prova nel suolo, si raccomanda una proporzione di 10 g di sabbia per ogni chilogrammo di suolo (peso secco). I campioni controllo sono trattati esclusivamente con una quantità equivalente di acqua e/o di sabbia di quarzo.

Se il test viene effettuato su sostanze chimiche volatili, occorre per quanto possibile evitare dispersioni durante il trattamento e cercare di assicurare una distribuzione omogenea nel suolo (ad es. la sostanza di prova deve essere iniettata in diversi punti del suolo).

1.6.6 **Concentrazioni di prova**

Se il test è effettuato su prodotti agrochimici, devono essere utilizzate almeno due concentrazioni. La concentrazione più bassa deve corrispondere almeno alla quantità massima che si prevede possa effettivamente penetrare nel suolo, mentre la concentrazione più elevata deve essere un multiplo della concentrazione più bassa. Le concentrazioni della sostanza di prova aggiunte al suolo sono calcolate supponendo un'incorporazione uniforme ad una profondità di 5 cm ed una densità apparente del suolo di 1,5 g/cm^3. Per i prodotti agrochimici applicati direttamente al suolo o per le sostanze chimiche di cui si può prevedere la quantità che penetra nel suolo, le concentrazioni di prova raccomandate sono la massima concentrazione ambientale prevista (PEC) ed il suo quintuplo. Le sostanze per le quali si prevedono più applicazioni al suolo nel corso di una stagione devono essere testate a concentrazioni calcolate moltiplicando la PEC per il numero massimo di applicazioni previste. Tuttavia la più alta concentrazione testata non deve superare il decuplo della dose massima di applicazione. Se invece il test è effettuato su altri tipi di sostanze chimiche, si utilizza una serie geometrica di almeno cinque concentrazioni. Il range delle concentrazioni testate deve essere tale da consentire di determinare i valori CE_x.

▼B

1.7 ESECUZIONE DEL TEST

1.7.1 **Condizioni di esposizione**

1.7.1.1 *Trattamento e controllo*

Qualora il test sia condotto su prodotti agrochimici, il suolo viene suddiviso in tre porzioni di uguale peso. Due di esse sono miscelate con il vettore contenente la sostanza chimica, mentre la terza è miscelata soltanto con il vettore, senza aggiunta di alcuna sostanza (campione controllo). Si raccomanda di utilizzare almeno tre repliche sia per i campioni di suolo trattato, sia per quelli di controllo. Nei test su altri tipi di sostanze chimiche il suolo viene suddiviso in sei porzioni di uguale peso. Cinque campioni vengono miscelati con il vettore contenente la sostanza di prova, mentre il sesto è miscelato unicamente con il vettore, senza aggiungere la sostanza chimica. Si raccomanda di utilizzare almeno tre repliche sia per i campioni di suolo trattato sia per quelli di controllo. Bisogna cercare di assicurare una distribuzione omogenea della sostanza di prova nei campioni di suolo trattati. Durante la miscelazione occorre evitare di compattare o agglomerare il suolo.

1.7.1.2 *Incubazione dei campioni*

L'incubazione dei campioni di suolo può essere effettuata in due modi: utilizzando un campione globale di suolo trattato ed uno di suolo non trattato o invece una serie di sottocampioni elementari e di uguali dimensioni di suolo trattato e di suolo non trattato. Tuttavia per le sostanze volatili il test deve necessariamente essere effettuato utilizzando una serie di sottocampioni. Se si opta per l'incubazione in un campione globale occorre preparare grandi quantità sia di suolo trattato sia di suolo non trattato e, durante il test, procedere secondo necessità al prelievo dei vari sottocampioni da analizzare. La quantità inizialmente preparata per il trattamento e per i controlli dipende dalla dimensione dei sottocampioni, dal numero di repliche utilizzate per l'analisi e dal numero massimo di tempi di campionamento previsti. I suoli incubati in un campione globale devono essere accuratamente mescolati prima di procedere al prelievo di sottocampioni. Se invece i suoli sono incubati in una serie di sottocampioni, il suolo trattato e quello non trattato vengono suddivisi nel numero di sottocampioni necessario, e questi ultimi vengono utilizzati a seconda del bisogno. Negli esperimenti in cui si possono prevedere più di due tempi di campionamento deve essere preparato un numero sufficiente di sottocampioni per tener conto di tutte le repliche e di tutti i tempi di campionamento. Per il test devono essere incubate in condizioni aerobiche almeno tre repliche di campioni di suolo (cfr. paragrafo 1.7.1.1.) Durante tutti i test devono essere utilizzati appositi contenitori con uno spazio di testa sufficiente ad evitare che si sviluppino condizioni anaerobiche. Se il test è effettuato su sostanze volatili, il metodo da impiegare è necessariamente quello dei sottocampioni.

1.7.1.3 *Condizioni e durata del test*

Il test viene eseguito al buio ad una temperatura ambiente di 20 ± 2 °C. Durante il test il contenuto di umidità dei campioni deve essere mantenuto tra il 40 % ed il 60 % della capacità massima di ritenzione idrica del suolo (cfr. paragrafo 1.6.4.2), con un margine di variazione di ± 5 %. Se necessario può essere aggiunta acqua distillata e deionizzata.

La durata minima dei test è di 28 giorni. Se il test è effettuato su prodotti agrochimici, i tassi di formazione di nitrati nei campioni trattati vengono comparati con quelli riscontrati nei campioni controllo. Se al ventottesimo giorno la differenza è superiore al 25 %, il test prosegue fino al raggiungimento di una differenza uguale o inferiore al 25 % o per un massimo di 100 giorni. Per le sostanze diverse dai prodotti agrochimici il test termina dopo 28 giorni. Al ventottesimo giorno vengono determinate le quantità di nitrati nei campioni trattati e nei campioni controllo e calcolati i valori CE_x.

▼B

1.7.2 **Campionamento e analisi dei suoli**

1.7.2.1 *Programma di campionamento*

Se il test è condotto su prodotti agrochimici occorre analizzare i campioni di suolo per misurare la quantità di nitrati nei giorni 0, 7, 14 e 28. Qualora la durata del test debba essere prolungata, le successive misurazioni vengono effettuate ad intervalli di 14 giorni a partire dal ventottesimo giorno.

Se il test è condotto su sostanze diverse dai prodotti agrochimici, si utilizzano almeno cinque concentrazioni di prova e l'analisi dei nitrati sui campioni di suolo viene effettuata all'inizio (giorno 0) e alla fine del periodo di esposizione (giorno 28). Se necessario si può ricorrere ad una misurazione intermedia, ad esempio il giorno 7. I dati ottenuti il ventottesimo giorno sono utilizzati per determinare il valore CE_x per la sostanza chimica. Eventualmente i dati ottenuti dai campioni controllo il giorno 0 possono essere utilizzati come misura della quantità iniziale di nitrati nel suolo.

1.7.2.2 *Analisi dei campioni di suolo*

Ad ogni campionamento viene determinata la quantità di nitrati formata in ciascuna replica dei campioni trattati e dei campioni controllo. I nitrati vengono estratti dal suolo agitando i campioni con idoneo solvente di estrazione, ad es. una soluzione 0,1 M di cloruro di potassio. Si raccomanda di utilizzare 5 ml di soluzione KCl per grammo di suolo (peso secco equivalente). Per ottimizzare l'estrazione il campione di suolo e la soluzione di estrazione non devono occupare più della metà del volume del contenitore. La miscela viene agitata a 150 giri al minuto per 60 minuti e poi centrifugata o filtrata; vengono quindi analizzate le fasi liquide per misurare i nitrati. Gli estratti liquidi privi di particelle possono essere stoccati prima dell'analisi ad una temperatura di - 20 ± 5 °C per un massimo di sei mesi.

2. **DATI**

2.1 TRATTAMENTO DEI RISULTATI

Se il test è effettuato su prodotti agrochimici si registra la quantità di nitrati formata in ciascun campione replicato di suolo, e i valori medi di tutti i campioni replicati devono essere riportati in una tabella. I tassi di trasformazione dell'azoto devono essere analizzati con metodi statistici adeguati e comunemente accettati (ad es. F-test, soglia di significatività del 5 %). La quantità di nitrati è espressa in mg/kg di suolo (peso secco)/die. Il tasso di formazione di nitrati riscontrato in ciascun campione trattato viene comparato con quello del campione controllo e viene calcolato lo scarto percentuale tra i due campioni.

Se il test è effettuato su altre sostanze chimiche, viene determinata la quantità di nitrati formata in ciascun campione replicato e viene costruita una curva dose-risposta per stimare i valori CE_x. La quantità di nitrati ottenuta dopo 28 giorni nei campioni trattati, espressa in mg di nitrati/kg di suolo (peso secco), viene comparata con quella riscontrata nei campioni controllo. I risultati vengono utilizzati per calcolare i valori percentuali di inibizione per ogni concentrazione di prova. Su un grafico si riportano le percentuali ottenute in funzione delle concentrazioni e con metodi statistici vengono calcolati i valori CE_x. Con procedure standard vengono determinati anche gli intervalli di confidenza ($p = 0,95$) dei valori CE_x (10)(11)(12).

Le sostanze di prova che contengono elevate quantità di azoto possono contribuire alla quantità di nitrati che si forma nel corso del test. Se queste sostanze sono testate a concentrazioni elevate (come avviene ad es. per le sostanze chimiche per cui si prevedono applicazioni ripetute) il test deve prevedere adeguati controlli, ad esempio aggiungendo al suolo la sostanza di prova ma non la farina vegetale. I risultati dei controlli devono essere presi in considerazione nel calcolo dei valori CE_x.

▼B

2.2 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Nella valutazione dei risultati dei test sui prodotti agrochimici, se in un qualsiasi campionamento effettuato dopo il ventottesimo giorno la differenza tra i tassi di formazione dei nitrati nel campione di suolo trattato con la concentrazione più bassa (cioè la massima concentrazione prevista) e nel campione controllo è uguale o inferiore al 25 %, si può ritenere che la sostanza testata non produce effetti a lungo termine sulla trasformazione dell'azoto nel suolo. Per la valutazione dei risultati dei test su sostanze diverse dai prodotti agrochimici si utilizzano i valori CE_{50}, CE_{25} e/o CE_{10}.

3. **RELAZIONE**

La relazione sull'esecuzione del test deve contenere le seguenti informazioni:

Completa identificazione del suolo utilizzato comprendente:

— coordinate geografiche del sito (latitudine, longitudine);

— informazioni sulla storia del sito (tipo di copertura vegetale, trattamenti con prodotti fitosanitari, trattamenti con fertilizzanti, casi di contaminazione accidentale, ecc.);

— destinazione (ad es. suolo agricolo, forestale, ecc.);

— profondità del campionamento (cm);

— contenuto in sabbia/limo/argilla (% peso secco);

— pH (in acqua);

— contenuto di carbonio organico (% peso secco);

— contenuto di azoto (% peso secco);

— concentrazione iniziale di nitrati (mg di nitrati/kg peso secco);

— capacità di scambio cationico (mmol/kg);

— biomassa microbica (in termini di percentuale del carbonio organico totale);

— indicazione dei metodi utilizzati per la determinazione di ciascun parametro;

— tutte le informazioni relative al prelievo e allo stoccaggio dei campioni di suolo;

— informazioni dettagliate sulla eventuale pre-incubazione del suolo.

Sostanza di prova:

— natura fisica e (se pertinenti) proprietà fisico-chimiche;

— dati di identificazione chimica (se pertinenti), compresa la formula strutturale, la purezza (per i prodotti fitosanitari, la percentuale di ingrediente attivo), il contenuto di azoto.

Substrato:

origine del substrato;

— composizione (farina di erba medica, farina di erba medica verde);

— contenuto di carbonio e di azoto (% peso secco);

— dimensione delle maglie del setaccio (mm).

▼B

Condizioni del test:

informazioni dettagliate sull'ammendamento del suolo con substrato organico;

— numero di concentrazioni della sostanza chimica di prova utilizzata e, ove opportuno, giustificazione delle concentrazioni scelte;

— informazioni dettagliate sulle modalità di applicazione al suolo della sostanza di prova;

— temperatura di incubazione;

— contenuto di umidità del suolo all'inizio e nel corso del test;

— metodo di incubazione del suolo (campione globale o serie di sottocampioni);

— numero di repliche dei campioni;

— tempi di campionamento;

— metodi utilizzati per l'estrazione dei nitrati dal suolo.

Risultati:

procedure analitiche e strumenti utilizzati per l'analisi dei nitrati;

— tabelle dei risultati, con i valori singoli ed i valori medi della misurazione dei nitrati;

— variazioni tra le differenti repliche dei campioni trattati e dei campioni controllo;

— giustificazioni delle eventuali correzioni apportate ai calcoli;

— scarto percentuale tra i tassi di formazione dei nitrati per ciascun campionamento o, se opportuno, valore CE_{50} con un intervallo di confidenza del 95 %, altri valori CE_x (CE_{25} o CE_{10}) con i rispettivi intervalli di confidenza e grafico della curva dose-risposta;

— trattamento statistico dei risultati;

— altre informazioni e osservazioni utili per l'interpretazione dei risultati.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality — Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality — Biological Methods.*

▼B

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigationextraction method.

(10) Litchfield, J.T. e Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.22. MICRORGANISMI DEL SUOLO: TEST DI TRASFORMAZIONE DEL CARBONIO

1. METODO

Questo metodo di prova corrisponde al TG 217 (2000) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Qui di seguito è descritto un metodo di laboratorio messo a punto per studiare i potenziali effetti a lungo termine di un'unica esposizione a prodotti fitosanitari e possibilmente ad altre sostanze chimiche sull'attività di trasformazione del carbonio ad opera dei microrganismi del suolo. Il test si basa principalmente sulle raccomandazioni dell'Organizzazione europea e mediterranea per la protezione delle piante (1), ma tiene conto anche delle linee guida formulate dal Centro federale tedesco di ricerca biologica per l'agricoltura e la silvicoltura *(Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft)* (2), dall'Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti *(Environmental Protection Agency)* (3), e dal SETAC (4). Il numero ed il tipo di suoli da utilizzare nel test sono stati concordati in occasione di un *workshop* dell'OCSE sulla selezione dei suoli e dei sedimenti, svoltosi a Belgirate nel 1995 (5). Le raccomandazioni riguardanti il prelievo, la manipolazione e lo stoccaggio dei campioni di suolo si basano su linee guida ISO (6) e sulle raccomandazioni formulate dal *workshop* di Belgirate.

Per accertare e valutare le caratteristiche tossiche delle sostanze di prova può essere necessario determinarne gli effetti sull'attività microbica del suolo, ad esempio quando occorre disporre di dati sui potenziali effetti collaterali dei prodotti fitosanitari sulla microflora del suolo o quando si prevede un'esposizione dei microrganismi del suolo ad altri tipi di sostanze chimiche. Il test di trasformazione del carbonio viene effettuato per determinare gli effetti di tali sostanze chimiche sulla microflora del suolo. Qualora siano testati prodotti agrochimici (ad es. fitosanitari, fertilizzanti, prodotti chimici per la silvicoltura), oltre al test di trasformazione dell'azoto si effettua anche il test di trasformazione del carbonio. Per le altre sostanze chimiche è invece sufficiente il test di trasformazione dell'azoto. Tuttavia se i valori CE_{50} riscontrati per queste sostanze nel test di trasformazione dell'azoto corrispondono a quelli degli inibitori della nitrificazione disponibili in commercio (ad es. nitrapirina), per ottenere maggiori informazioni può essere effettuato anche il test di trasformazione del carbonio.

I suoli sono costituiti da miscele eterogenee e complesse di componenti viventi e non viventi. I microrganismi svolgono un ruolo importante nella decomposizione e nella trasformazione della materia organica in suolo fertile, contribuendo in maniera differente a seconda delle specie ai vari aspetti della fertilizzazione. Eventuali interferenze con questi processi biochimici rischiano a lungo termine di influenzare il ciclo delle sostanze nutritive e di alterare la fertilità del suolo. La trasformazione del carbonio e dell'azoto avviene in tutti i suoli fertili; anche se le comunità microbiche responsabili di questi processi variano a seconda del tipo di suolo, le vie di trasformazione sono sostanzialmente le stesse.

▼B

Il metodo di prova di seguito descritto è stato concepito per individuare gli effetti nocivi a lungo termine di una data sostanza sul processo di trasformazione del carbonio nei suoli aerobici superficiali. Il test è sensibile alle variazioni di dimensione e di attività delle comunità microbiche responsabili della trasformazione del carbonio in quanto sottopone tali comunità sia ad uno stress chimico che ad una carenza di carbonio. Viene utilizzato un suolo sabbioso con un basso contenuto di materia organica, che viene trattato con la sostanza di prova ed incubato in condizioni che consentono un rapido metabolismo microbico. In tali condizioni, le fonti di carbonio prontamente disponibile nel suolo si esauriscono rapidamente. Ciò provoca una carenza di carbonio, che da un lato provoca la morte delle cellule microbiche e dall'altro induce dormienza e/o sporulazione. Se il test prosegue per più di 28 giorni, la somma di queste reazioni può essere misurata nei campioni controllo (costituiti da suolo non trattato) come perdita progressiva di biomassa microbica metabolicamente attiva (7). Se nelle condizioni di esecuzione del test la biomassa del suolo sottoposto a stress da carenza di carbonio subisce la presenza di una sostanza chimica, è possibile che essa non riesca a tornare allo stesso livello del campione controllo, per cui si può dedurre che le perturbazioni provocate dalla sostanza di prova in un qualsiasi momento del test spesso dureranno fino alla fine del test.

I test su cui si basa questo metodo di prova sono stati originariamente concepiti per sostanze di cui è possibile stimare la quantità che penetra nel suolo. È il caso, ad esempio, dei prodotti fitosanitari, la cui dose di applicazione nel terreno è conosciuta. Per i prodotti agrochimici è sufficiente utilizzare due concentrazioni di prova, corrispondenti alla dose di applicazione prevista o stimata; tali prodotti possono essere testati come ingredienti attivi (i.a.) o come prodotti formulati. Tuttavia il test non si limita alle sostanze chimiche le cui concentrazioni ambientali siano prevedibili; cambiando sia la quantità della sostanza di prova applicata al suolo sia le modalità di valutazione dei dati il test può infatti essere utilizzato anche per altre sostanze chimiche, di cui non si conosca la quantità che penetra nel suolo; in questo caso è possibile determinare gli effetti sulla trasformazione del carbonio di una serie di concentrazioni. I dati ottenuti sono utilizzati per costruire una curva dose-risposta e calcolare i valori CE_x, dove x è la percentuale di effetto.

1.2 DEFINIZIONI

Trasformazione del carbonio: degradazione ad opera dei microrganismi di materia organica, con formazione di un prodotto finale inorganico, l'anidride carbonica.

CE_x (concentrazione efficace): concentrazione della sostanza di prova nel suolo che determina un'inibizione dell'x per cento nella trasformazione del carbonio in anidride carbonica.

CE_{50} (concentrazione efficace media): concentrazione della sostanza di prova nel suolo che determina un'inibizione del 50 % nella trasformazione del carbonio in anidride carbonica.

1.3 SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

▼B

1.4 PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA

Dopo la setacciatura, una parte del suolo viene trattata con la sostanza di prova mentre un'altra parte non è sottoposta ad alcun trattamento (controllo). Se il test è effettuato su prodotti agrochimici si raccomanda di utilizzare almeno due concentrazioni di prova, scelte in relazione alla massima concentrazione prevista nel terreno. Dopo 0, 7, 14 e 28 giorni di incubazione, i campioni di suolo trattati con la sostanza di prova e i campioni controllo sono miscelati con glucosio e per 12 ore consecutive vengono misurati i tassi di respirazione indotta dal glucosio, espressi in termini di anidride carbonica emessa (mg di anidride carbonica/kg di suolo peso secco/ora) o di ossigeno consumato (mg di ossigeno/kg di suolo/ora). Il tasso di respirazione medio dei campioni di suolo trattato viene comparato con quello dei campioni controllo e viene calcolata la percentuale di scarto del campione trattato rispetto al campione controllo. Tutti i test durano almeno 28 giorni. Se al ventottesimo giorno le differenze tra i campioni trattati e non trattati sono uguali o superiori al 25 %, le misurazioni continuano ad intervalli di 14 giorni fino ad un massimo di 100 giorni. Se il test è effettuato su prodotti non agrochimici, ai campioni di suolo viene aggiunta la sostanza di prova in diverse concentrazioni e dopo 28 giorni vengono misurati i tassi di respirazione indotta dal glucosio (cioè la media delle quantità di anidride carbonica prodotta o di ossigeno consumato). I risultati dei test effettuati con una serie di concentrazioni sono analizzati mediante un modello di regressione; infine vengono calcolati i valori CE_x (CE_{50}, CE_{25} e/o CE_{10}. Cfr. in proposito le definizioni).

1.5 VALIDITÀ DEL TEST

Le analisi dei risultati del test sui prodotti agrochimici si basano su differenze relativamente modeste (valore medio ± 25 %) tra l'anidride carbonica emessa o l'ossigeno consumato nei (o dai) campioni di suolo trattato e nei controlli, e dunque la presenza di forti variazioni tra i campioni controllo può portare a falsi risultati. Pertanto la variazione tra le diverse repliche dei campioni controllo deve essere inferiore a ± 15 %.

1.6 DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

1.6.1 **Apparecchiatura**

Per il test sono utilizzati contenitori di materiale chimicamente inerte, di capacità adeguata al metodo di incubazione del suolo utilizzato (ad es. in un campione globale o in una serie di campioni singoli: cfr. paragrafo 1.7.1.2). Occorre adottare le precauzioni necessarie per ridurre al minimo l'evaporazione di acqua e consentire lo scambio di gas durante il test (ad es. i contenitori utilizzati per il test possono essere coperti con un foglio di polietilene perforato). Per i test su sostanze volatili, devono essere utilizzati contenitori a chiusura ermetica e a tenuta di gas, di dimensioni tali che il campione di suolo occupi all'incirca un quarto del volume.

Per determinare i tassi di respirazione indotta dal glucosio sono necessari sistemi di incubazione e strumenti per la misurazione della produzione di anidride carbonica o del consumo di ossigeno. La letteratura scientifica citata in bibliografia riporta alcuni esempi di sistemi e strumenti utilizzabili [cfr. (8) (9) (10) (11)].

1.6.2 **Selezione e numero di suoli**

Si utilizza un unico suolo, per il quale si raccomandano le seguenti caratteristiche:

— contenuto in sabbia: non inferiore al 50 % e non superiore al 75 %;

▼B

— pH: 5,5- 7,5;

— contenuto di carbonio organico: 0,5- 1,5 %;

— deve essere misurata la biomassa microbica (12)(13), il cui contenuto di carbonio deve corrispondere almeno all'1 % del carbonio organico totale del suolo.

Nella maggior parte dei casi un suolo con queste caratteristiche rappresenta l'ipotesi più sfavorevole, in quanto l'adsorbimento della sostanza chimica di prova è minimo, mentre la disponibilità per la microflora è massima e dunque in genere non è necessario effettuare il test con altri suoli. Tuttavia in alcune circostanze, ad esempio quando si prevede un uso prevalente della sostanza di prova su particolari tipi di suolo (ad es. i suoli forestali acidi) o per sostanze chimiche con carica elettrostatica, può essere necessario utilizzare un suolo aggiuntivo.

1.6.3 **Prelievo e stoccaggio dei campioni di suolo**

1.6.3.1 *Prelievo*

Devono essere disponibili informazioni dettagliate sulla storia del sito di campionamento, tra cui l'esatta ubicazione, il tipo di copertura vegetale, le date dei trattamenti con prodotti fitosanitari e con fertilizzanti organici o inorganici, l'eventuale applicazione di materiali biologici ed i casi di contaminazione accidentale. Il sito scelto per il prelievo del suolo deve consentire cicli molto lunghi; sono perciò adatti i pascoli permanenti, i terreni destinati a colture cerealicole annuali (ad eccezione del granturco) o da sovescio a semina fitta. Il sito di campionamento scelto non deve essere stato sottoposto a trattamenti con prodotti fitosanitari da almeno un anno e da almeno sei mesi non devono essere stati applicati fertilizzanti organici. L'uso di fertilizzanti minerali è ammesso solo se richiesto dal tipo di coltura in atto ed in questo caso il prelievo di campioni di suolo deve essere effettuato almeno tre mesi dopo l'applicazione del fertilizzante. Bisogna evitare di utilizzare suoli trattati con fertilizzanti di cui siano noti gli effetti biocidi (ad es. calciocianammide).

Il prelievo di campioni non deve avvenire durante o subito dopo lunghi periodi (> 30 giorni) di siccità o di saturazione idrica del terreno. Nei suoli arati i campioni devono essere prelevati ad una profondità compresa tra 0 e 20 cm. Nei suoli a prato o a pascolo o in altri suoli che non vengono arati per lunghi periodi (almeno un ciclo vegetativo) la profondità massima di campionamento può essere leggermente superiore a 20 cm (ad es. fino a 25 cm). I campioni devono essere trasportati in contenitori adeguati e in condizioni di temperatura tali da garantire che le proprietà iniziali del suolo non vengano alterate in maniera significativa.

1.6.3.2 *Stoccaggio*

È preferibile l'uso di suoli appena prelevati dal terreno. Qualora non si possa evitare lo stoccaggio in laboratorio, i suoli possono essere conservati al buio ad una temperatura di 4 ± 2 °C per un massimo di tre mesi. Durante lo stoccaggio deve essere assicurato il mantenimento in condizioni aerobiche. Se i suoli vengono prelevati da zone in cui gelano per almeno tre mesi l'anno, si può prendere in considerazione lo stoccaggio per sei mesi ad una temperatura compresa tra - 18 °C e - 22 °C. Prima di ogni esperimento viene misurata la biomassa microbica dei suoli: il carbonio presente nella biomassa deve essere pari almeno all'1 % del contenuto di carbonio organico totale nel suolo (cfr. paragrafo 1.6.2).

▼B

1.6.4 **Manipolazione e preparazione del suolo**

1.6.4.1 *Pre-incubazione*

Se il suolo è stato stoccato (cfr. paragrafi 1.6.4.2 e 1.7.1.3), si raccomanda la pre-incubazione per un periodo compreso tra 2 e 28 giorni. Durante la pre-incubazione la temperatura e il contenuto di umidità del suolo devono essere analoghi a quelli del test (cfr. paragrafi 1.6.4.2 e 1.7.1.3).

1.6.4.2 *Caratteristiche fisico-chimiche*

Dopo la rimozione manuale di particelle di grandi dimensioni (ad es. sassi, parti di piante, ecc.) il suolo viene setacciato ad umido, evitando l'eccessiva essiccazione, in modo tale che la dimensione dei granuli sia inferiore o uguale a 2 mm. Il contenuto di umidità del campione di suolo deve essere regolato con acqua distillata o deionizzata ad un valore compreso tra il 40 % ed il 60 % della capacità massima di ritenzione idrica.

1.6.5 **Preparazione della sostanza di prova per l'applicazione al suolo**

Normalmente la sostanza di prova è applicata utilizzando un vettore, che può essere l'acqua (per le sostanze idrosolubili) o un solido inerte come la sabbia di quarzo fine (diametro: 0,1- 0,5 mm). Si deve evitare l'uso di vettori liquidi diversi dall'acqua (ad es. solventi organici come l'acetone o il cloroformio) in quanto possono danneggiare la microflora. Se il vettore utilizzato è la sabbia, quest'ultima può essere rivestita con la sostanza di prova, disciolta o posta in sospensione in un solvente adeguato. In questi casi il solvente deve essere eliminato per evaporazione prima della miscelazione con il suolo. Per consentire una distribuzione ottimale della sostanza di prova nel suolo, si raccomanda una proporzione di 10 g di sabbia per ogni chilogrammo di suolo (peso secco). I campioni controllo sono trattati esclusivamente con la quantità equivalente di acqua e/o di sabbia di quarzo.

Se il test viene effettuato su sostanze chimiche volatili, occorre per quanto possibile evitare dispersioni durante il trattamento e cercare di assicurare una distribuzione omogenea nel suolo (ad es. la sostanza di prova deve essere iniettata in diversi punti del suolo).

1.6.6 **Concentrazioni di prova**

Se il test è effettuato su prodotti agrochimici o su altre sostanze chimiche le cui concentrazioni ambientali siano prevedibili, devono essere utilizzate almeno due concentrazioni di prova. La concentrazione più bassa deve corrispondere almeno alla quantità massima che si prevede possa effettivamente penetrare nel suolo, mentre la concentrazione più elevata deve essere un multiplo della concentrazione più bassa. Le concentrazioni della sostanza di prova aggiunte al suolo sono calcolate supponendo un'incorporazione uniforme ad una profondità di 5 cm ed una densità apparente del suolo di 1,5 g/cm^3. Per i prodotti agrochimici applicati direttamente al suolo o per le sostanze chimiche di cui si può prevedere la quantità che penetra nel suolo, le concentrazioni di prova raccomandate sono la massima concentrazione ambientale prevista (PEC) ed il suo quintuplo. Le sostanze per le quali si prevedono più applicazioni al suolo nel corso di una stagione devono essere testate a concentrazioni calcolate moltiplicando la PEC per il numero massimo di applicazioni previste. Tuttavia la più alta concentrazione testata non deve superare il decuplo della dose massima di applicazione.

Se invece il test è effettuato su altri tipi di sostanze chimiche, si utilizza una serie geometrica di almeno cinque concentrazioni. Il range delle concentrazioni testate deve essere tale da consentire di determinare i valori CE_x.

▼B

1.7 ESECUZIONE DEL TEST

1.7.1 **Condizioni di esposizione**

1.7.1.1 *Trattamento e controllo*

Qualora il test sia condotto su prodotti agrochimici, il suolo viene suddiviso in tre porzioni di uguale peso. Due di esse sono miscelate con il vettore contenente la sostanza chimica, mentre la terza è miscelata soltanto con il vettore, senza aggiunta della sostanza (campione controllo). Si raccomanda di utilizzare almeno tre repliche sia per i campioni di suolo trattato sia per quelli di controllo. Nei test su altri tipi di sostanze chimiche il suolo viene suddiviso in sei porzioni di uguale peso. Cinque campioni vengono miscelati con il vettore contenente la sostanza di prova, mentre il sesto è miscelato unicamente con il vettore, senza aggiungere la sostanza chimica. Si raccomanda di utilizzare almeno tre repliche sia per i campioni di suolo trattato sia per quelli di controllo. Bisogna cercare di assicurare una distribuzione omogenea della sostanza di prova nei campioni di suolo trattati. Durante la miscelazione, bisogna evitare di compattare o di agglomerare il suolo.

1.7.1.2 *Incubazione dei campioni*

L'incubazione dei campioni di suolo può essere effettuata in due modi: utilizzando un campione globale di suolo trattato ed uno di suolo non trattato o invece una serie di sottocampioni elementari e di uguali dimensioni di suolo trattato e di suolo non trattato. Tuttavia per le sostanze volatili il test deve necessariamente essere effettuato utilizzando una serie di sottocampioni. Se si opta per l'incubazione in un campione globale, occorre preparare grandi quantità sia di suolo trattato sia di suolo non trattato e, durante il test, procedere secondo necessità al prelievo dei vari sottocampioni da analizzare. La quantità inizialmente preparata per il trattamento e i controlli dipende dalla dimensione dei sottocampioni, dal numero di repliche utilizzate per l'analisi e dal numero massimo di tempi di campionamento previsti. I suoli incubati in un campione globale devono essere accuratamente mescolati prima di procedere al prelievo di sottocampioni. Se invece i suoli sono incubati in una serie di sottocampioni, il suolo trattato e quello non trattato vengono suddivisi nel numero di sottocampioni necessario, e questi ultimi vengono utilizzati a seconda del bisogno. Negli esperimenti in cui si possono prevedere più di due tempi di campionamento deve essere preparato un numero sufficiente di sottocampioni per tener conto di tutte le repliche e di tutti i tempi di campionamento. Per il test devono essere incubate in condizioni aerobiche almeno tre repliche di campioni di suolo (cfr. paragrafo 1.7.1.1.) Durante tutti i test devono essere utilizzati appositi contenitori con uno spazio di testa sufficiente ad evitare che si sviluppino condizioni anaerobiche. Se il test è effettuato su sostanze volatili, il metodo da impiegare è necessariamente quello dei sottocampioni.

1.7.1. *Condizioni e durata del test*

Il test viene eseguito al buio ad una temperatura ambiente di 20 ± 2 °C. Durante il test il contenuto di umidità dei campioni deve essere mantenuto tra il 40 % ed il 60 % della capacità massima di ritenzione idrica del suolo (cfr. paragrafo 1.6.4.2), con un margine di variazione di ± 5 %. Se necessario può essere aggiunta acqua distillata e deionizzata.

La durata minima dei test è di 28 giorni. Se il test è effettuato su prodotti agrochimici, viene comparata la quantità di anidride carbonica emessa o di ossigeno consumato nei campioni trattati e nei controlli. Se al ventottesimo giorno la differenza è superiore al 25 %, il test prosegue fino al raggiungimento di una differenza uguale o inferiore al 25 % o per un massimo di 100 giorni. Per le sostanze diverse dai prodotti agrochimici il test termina dopo 28 giorni. Al ventottesimo giorno viene determinata la quantità di anidride carbonica emessa o di ossigeno consumato nei campioni trattati e in quelli di controllo e vengono calcolati i valori CE_x.

▼B

1.7.2 **Campionamento e analisi dei suoli**

1.7.2.1 *Programma di campionamento*

Se il test è condotto su prodotti agrochimici occorre analizzare i campioni di suolo per misurare i tassi di respirazione indotta dal glucosio nei giorni 0, 7, 14 e 28. Qualora la durata del test debba essere prolungata, le successive misurazioni vengono effettuate ad intervalli di 14 giorni a partire dal ventottesimo giorno.

Se il test è condotto su sostanze diverse dai prodotti agrochimici, si utilizzano almeno cinque concentrazioni di prova e l'analisi dei tassi di respirazione indotta dal glucosio viene effettuata all'inizio (giorno 0) e alla fine del periodo di esposizione (giorno 28). Se necessario si può ricorrere ad una misurazione intermedia, ad esempio il giorno 7. I dati ottenuti il ventottesimo giorno sono utilizzati per determinare il valore CE_x per la sostanza chimica. Eventualmente i dati ottenuti dai campioni controllo il giorno 0 possono essere utilizzati come misura della quantità iniziale di biomassa microbica metabolicamente attiva nel suolo (12).

1.7.2.2 *Misura dei tassi di respirazione indotta dal glucosio*

Ad ogni campionamento viene determinato il tasso di respirazione indotta dal glucosio in ciascuna replica dei campioni trattati e dei campioni controllo. I campioni di suolo vengono miscelati con una quantità di glucosio sufficiente a provocare una reazione respiratoria massima immediata. La quantità di glucosio necessaria per provocare una reazione respiratoria massima in un dato suolo può essere determinata in un test preliminare con una serie di concentrazioni della sostanza (14). Tuttavia, nel caso di suoli sabbiosi con un contenuto di carbonio organico compreso tra lo 0,5 e l'1,5 %, in genere è sufficiente una quantità di glucosio compresa tra 2 000 e 4 000 mg per chilogrammo di suolo (peso secco). Il glucosio può essere ridotto in polvere con sabbia di quarzo fine [10 g di sabbia/kg di suolo (peso secco)] e miscelato con il suolo in modo tale da assicurarne una distribuzione omogenea.

I campioni di suolo arricchiti con glucosio vengono incubati a 20 ± 2 °C in un apparecchio che consenta di misurare i tassi di respirazione in modo continuo, ogni ora, oppure ogni due ore (cfr. paragrafo 1.6.1). Per 12 ore consecutive vengono misurati l'anidride carbonica emessa o l'ossigeno consumato. Le misurazioni devono iniziare quanto prima, cioè entro 1-2 ore dall'aggiunta del glucosio. Dopo aver misurato la quantità totale di anidride carbonica emessa o di ossigeno consumato nel corso delle 12 ore, vengono determinati i tassi medi di respirazione.

2. **DATI**

2.1 TRATTAMENTO DEI RISULTATI

Se il test è effettuato su prodotti agrochimici si registra la quantità di anidride carbonica emessa o di ossigeno consumato da ciascun campione replicato di suolo e si riportano in una tabella i valori medi di tutti i campioni replicati. I risultati devono essere analizzati con metodi statistici adeguati e comunemente accettati (ad es. F-test, soglia di significatività del 5 %). I tassi di respirazione indotta dal glucosio sono espressi in mg di anidride carbonica/kg di suolo (peso secco)/ora o in mg di ossigeno/suolo (peso secco)/ora. Il tasso medio di produzione di anidride carbonica o il tasso medio di consumo di ossigeno riscontrato in ciascun campione trattato viene comparato con quello del campione controllo e viene calcolato lo scarto percentuale fra i due campioni.

▼B

Se il test è effettuato su altre sostanze chimiche, viene determinata la quantità di anidride carbonica emessa o di ossigeno consumato da ciascun campione replicato e viene costruita una curva dose-risposta per stimare i valori CE_x. I tassi di respirazione indotta dal glucosio riscontrati dopo 28 giorni nei campioni trattati [espressi in mg di anidride carbonica/kg di suolo (peso secco)/ora o in mg di ossigeno/suolo (peso secco)/ora] sono comparati con quelli dei campioni controllo. I risultati vengono utilizzati per calcolare i valori percentuali di inibizione per ogni concentrazione di prova. Su un grafico si riportano le percentuali ottenute in funzione delle concentrazioni e con metodi statistici vengono calcolati i valori CE_x. Con procedure standard vengono determinati anche gli intervalli di confidenza (p = 0,95) dei valori CE_x (15)(16)(17).

2.2 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Nella valutazione dei risultati dei test sui prodotti agrochimici, se in un qualsiasi campionamento effettuato dopo il ventottesimo giorno la differenza tra i tassi di respirazione nel campione di suolo trattato con la concentrazione più bassa (cioè la massima concentrazione prevista) e nel campione controllo è uguale o inferiore al 25 %, si può ritenere che la sostanza testata non produce effetti a lungo termine sulla trasformazione del carbonio nel suolo. Per la valutazione dei risultati dei test su sostanze diverse dai prodotti agrochimici si utilizzano i valori CE_{50}, CE_{25} e/o CE_{10}.

3. **RELAZIONE**

RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL TEST

La relazione sull'esecuzione del test deve contenere le seguenti informazioni:

Completa identificazione del suolo utilizzato comprendente:

— coordinate geografiche del sito (latitudine, longitudine);

— informazioni sulla storia del sito (tipo di copertura vegetale, trattamenti con prodotti fitosanitari, trattamenti con fertilizzanti, casi di contaminazione accidentale, ecc.);

— destinazione (ad es. suolo agricolo, forestale, ecc.);

— profondità del campionamento (cm);

— contenuto in sabbia/limo/argilla (% peso secco);

— pH (in acqua);

— contenuto di carbonio organico (% peso secco);

— contenuto di azoto (% peso secco);

— capacità di scambio cationico (mmol/kg);

— biomassa microbica iniziale (in termini di percentuale del carbonio organico totale);

— indicazione dei metodi utilizzati per la determinazione di ciascun parametro;

— tutte le informazioni relative al prelievo e allo stoccaggio dei campioni di suolo;

— informazioni dettagliate sulla eventuale pre-incubazione del suolo.

▼B

Sostanza di prova:

— natura fisica e (se pertinenti) proprietà fisico-chimiche;

— dati di identificazione chimica (se pertinenti), compresa la formula strutturale, la purezza (per i prodotti fitosanitari, la percentuale di ingrediente attivo), il contenuto di azoto.

Condizioni del test:

— informazioni dettagliate sull'ammendamento del suolo con substrato organico;

— numero di concentrazioni della sostanza chimica di prova utilizzata e, ove opportuno, giustificazione delle concentrazioni scelte;

— informazioni dettagliate sulle modalità di applicazione al suolo della sostanza di prova;

— temperatura di incubazione;

— contenuto di umidità del suolo all'inizio e nel corso del test;

— metodo di incubazione del suolo utilizzato (campione globale o serie di sottocampioni);

— numero di repliche dei campioni;

— tempi di campionamento.

Risultati:

— metodo e strumenti utilizzati per misurare i tassi di respirazione;

— tabelle dei risultati, con i valori singoli e i valori medi delle quantità di anidride carbonica o di ossigeno;

— variazioni tra le differenti repliche dei campioni trattati e dei campioni controllo;

— giustificazioni delle eventuali correzioni apportate ai calcoli;

— scarto percentuale tra i tassi di respirazione indotta dal glucosio registrati in ciascun campionamento o, se del caso, valore CE_{50} con un intervallo di confidenza del 95 %, altri valori CE_x (CE_{25} o CE_{10}) con i rispettivi intervalli di confidenza e grafico della curva dose-risposta;

— trattamento statistico dei risultati, ove opportuno;

— altre informazioni e osservazioni utili per l'interpretazione dei risultati.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼B

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in «Pesticide Effects on Soil Microflora». Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45-60.

(8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in «Methods of Soil Analysis — Part 2: Chemical and Microbiological Properties». Agronomy Monograph No 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41:831-871.

(9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality — Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(11) Heinemeyer O., Insam, H., Kaiser, E.A, Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.

(12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigationextraction method.

(14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38:113-120.

(15) Litchfield, J.T. — Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol, and Exper. Ther., 96, 99-113.

(16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.23. TRASFORMAZIONE AEROBICA E ANAEROBICA NEL SUOLO

1. METODO

Questo metodo corrisponde al TG 307 (2002) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Il presente metodo di test è basato sulle linee guida esistenti (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Il metodo descritto è progettato per determinare la trasformazione aerobica ed anaerobica delle sostanze chimiche nel suolo. Gli esperimenti eseguiti hanno l'obiettivo di determinare: i) la velocità di trasformazione della sostanza di prova e ii) la natura e la velocità di formazione e di diminuzione dei prodotti di trasformazione ai quali possono essere esposti piante ed organismi del suolo. Tali studi sono necessari per le sostanze chimiche che vengono applicate direttamente sul suolo o che abbiano probabilità di raggiungere l'ambiente del suolo. I risultati di questi studi di laboratorio possono essere utilizzati anche per sviluppare protocolli di campionamento e di analisi per studi correlati sul campo.

Per la valutazione delle vie di trasformazione sono in genere sufficienti gli studi aerobici ed anaerobici con un solo tipo di suolo (8)(10)(11). I tassi di trasformazione vanno determinati in almeno altri tre suoli (8)(10).

Un workshop dell'OCSE sulla selezione dei suoli e dei sedimenti, tenutosi a Belgirate nel 1995 (10), ha definito, in particolare, il numero e i tipi di suoli da usarsi in questo test. I tipi di suoli esaminati devono essere rappresentativi delle condizioni ambientali in cui la sostanza verrà usata o rilasciata. Per esempio, le sostanze chimiche che potrebbero essere rilasciate in climi subtropicali e tropicali vanno testate utilizzando Ferrasols o Nitosols (sistema FAO). Il workshop ha inoltre espresso raccomandazioni circa la raccolta, la manipolazione e la conservazione dei campioni, sulla base delle linee guida ISO (15). Questo metodo prevede anche l'uso di suoli per risaia.

1.2 DEFINIZIONI

Sostanza di prova: qualsiasi sostanza, sia un composto progenitore che i relativi prodotti di trasformazione.

Prodotti di trasformazione: tutte le sostanze derivanti da reazioni di trasformazione biotica o abiotica della sostanza di prova, compresi CO_2 e i prodotti che si trovano in residui non estraibili.

Residui non estraibili: i «residui non estraibili» sono sostanze nel suolo, nelle piante o negli animali, che dopo estrazione persistono nella matrice sotto forma di sostanza progenitrice o dei suoi metaboliti o prodotti di trasformazione. Il metodo di estrazione non deve alterare in modo considerevole le sostanze stesse o la struttura della matrice. La natura del legame può essere in parte chiarita mediante metodi di estrazione che alterano la matrice e sofisticate tecniche analitiche. Fino ad oggi, ad esempio, in questo modo sono stati identificati i legami ionici covalenti e di assorbimento/adsorbimento, oltre alle catture. In generale, la formazione di residui non estraibili riduce significativamente la bioaccessibilità e la biodisponibilità (12) [modificato da IUPAC 1984 (13)].

Trasformazione aerobica: reazioni che hanno luogo in presenza di ossigeno molecolare (14).

▼B

Trasformazione anaerobica: reazioni che hanno luogo in assenza di ossigeno molecolare (14).

Suolo: miscela di costituenti chimici organici e inorganici (questi ultimi contengono sostanze ad elevato contenuto di carbonio e azoto e di elevato peso molecolare), contenente organismi vitali di piccole dimensioni (soprattutto microrganismi). Il suolo può essere manipolato in due stati:

a) indisturbato, come si è sviluppato nel tempo, in strati caratteristici di diversi tipi di suolo;

b) disturbato, come si trova generalmente nei campi arabili o come si riscontra quando ne vengono prelevati campioni mediante scavo, che vengono utilizzati in questo metodo di test (14).

Mineralizzazione: completa degradazione di un composto organico in CO_2 e H_2O in condizioni aerobiche, e in CH_4, CO_2 e H_2O in condizioni anaerobiche. Nel contesto del presente metodo di test, quando si utilizza una sostanza marcata al ^{14}C, per mineralizzazione si intende una prolungata degradazione durante la quale un atomo di carbonio marcato viene ossidato con rilascio della corretta quantità di $^{14}CO_2$ (14).

Tempo di dimezzamento: $\mathbf{t_{0,5}}$, è il tempo necessario per una trasformazione del 50 % di una sostanza di prova, quando la trasformazione può essere descritta mediante cinetica di primo ordine; è indipendente dalla concentrazione.

DT_{50} (Tempo di scomparsa 50): tempo entro cui la concentrazione della sostanza di prova si riduce del 50 %; è diverso dal tempo di dimezzamento $t_{0,5}$ quando la trasformazione non segue la cinetica di primo ordine.

DT_{75} (Tempo di scomparsa 75): tempo entro cui la concentrazione della sostanza di prova si riduce del 75 %.

DT_{90} (Tempo di scomparsa 90): tempo entro cui la concentrazione della sostanza di prova si riduce del 90 %.

1.3 SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Per la caratterizzazione e/o l'identificazione dei prodotti di trasformazione mediante metodi spettroscopici e cromatografici si utilizzano sostanze di riferimento.

1.4 APPLICABILITÀ DEL TEST

Il metodo è applicabile a tutte le sostanze chimiche (non marcate o radiomarcate) per le quali è disponibile un metodo analitico sufficientemente accurato e sensibile. È applicabile a sostanze lievemente volatili, non volatili, idrosolubili e non idrosolubili. Il test non va applicato a sostanze chimiche altamente volatili dal suolo (ad es. fumiganti, solventi organici) che non possono essere tenute all'interno del suolo nelle condizioni sperimentali necessarie per questo test.

▼B

1.5 INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA DI PROVA

Per misurare la velocità di trasformazione è possibile usare una sostanza di prova non marcata o marcata. Il materiale marcato è necessario per lo studio della via di trasformazione e per definire un bilancio di massa. Si raccomanda la marcatura con ^{14}C, sebbene possa essere utile anche l'uso di altri isotopi, quali ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Per quanto possibile, la marcatura va applicata alla parte o alle parti più stabili della molecola ([1]). La purezza della sostanza di prova deve essere almeno del 95 %.

Prima di eseguire un test sulla trasformazione aerobica ed anaerobica nel suolo, devono essere disponibili le seguenti informazioni sulla sostanza di prova:

a) solubilità in acqua (Metodo A.6)

b) solubilità in solventi organici;

c) tensione di vapore (Metodo A.4) e costante della legge di Henry;

d) coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua (Metodo A. 8);

e) stabilità chimica al buio (idrolisi) (Metodo C.7);

f) pK_a se una molecola è soggetta a protonazione o deprotonazione (Linee guida OCSE 112) (16).

Altre informazioni utili possono essere costituite da dati sulla tossicità della sostanza di prova per i microrganismi del suolo (Metodi di test C.21 e C.22) (16).

Dovrebbero essere disponibili metodi analitici (compresi metodi per l'estrazione e di depurazione) per la quantificazione e l'identificazione della sostanza di prova e dei suoi prodotti di trasformazione.

1.6 PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA

I campioni di suolo vengono trattati con la sostanza di prova e incubati al buio in contenitori per biometria o in sistemi a flusso continuo in condizioni controllate di laboratorio (a temperatura e umidità costante del suolo). Dopo adeguati intervalli di tempo, i campioni di suolo vanno estratti e analizzati alla ricerca della sostanza progenitrice e dei prodotti di trasformazione. Mediante adeguati dispositivi di assorbimento vengono raccolti anche i prodotti volatili e sottoposti ad analisi. Impiegando materiale ^{14}C-marcato è possibile misurare i tassi di mineralizzazione della sostanza di prova intercettando il $^{14}CO_2$ evoluto e determinare un bilancio di massa, compresa la formazione di residui non estraibili.

1.7 CRITERI DI QUALITÀ

1.7.1 **Recupero**

L'estrazione e l'analisi di campioni di suolo almeno duplicati, immediatamente dopo l'aggiunta della sostanza di prova, forniscono una prima indicazione della ripetibilità del metodo analitico e dell'uniformità della procedura di applicazione per la sostanza di prova. Le percentuali di recupero per le fasi successive degli esperimenti sono determinate dai rispettivi bilanci di massa e dovrebbero essere comprese tra 90 % e 110 % per le sostanze chimiche marcate (8) e tra 70 % e 110 % per le sostanze chimiche non marcate (3).

([1]) Per esempio, se la sostanza di prova contiene un solo anello, è necessario marcare tale anello; se la sostanza contiene due anelli o più, possono risultare necessari studi separati per valutare il destino di ciascun anello marcato e per ottenere informazioni adeguate sulla formazione dei prodotti di trasformazione.

▼B

1.7.2 **Ripetibilità e sensibilità del metodo di analisi**

La ripetibilità del metodo di analisi (esclusa l'efficienza di estrazione iniziale) per quantificare la sostanza di prova e i prodotti di trasformazione può essere controllata duplicando l'analisi dello stesso estratto di suolo, incubato sufficientemente a lungo perché si formino prodotti di trasformazione.

Il limite di rivelabilità del metodo di analisi per la sostanza di prova e per i prodotti di trasformazione deve essere di almeno 0,01 mg kg^{-1} di suolo (come sostanza di prova) o dell'1 % della dose applicata (scegliere il dato inferiore). Il limite di quantificazione va anch'esso specificato.

1.7.3 **Accuratezza dei dati sulla trasformazione**

L'analisi di regressione delle concentrazioni della sostanza di prova in funzione del tempo fornisce dati adeguati circa l'affidabilità della curva di trasformazione e consente di calcolare gli intervalli di confidenza per i tempi di dimezzamento (in caso di cinetica di pseudo primo ordine) o i valori DT_{50} e, se del caso, DT_{75} e DT_{90}.

1.8 DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

1.8.1 **Apparecchiature e reagenti chimici**

I sistemi di incubazione sono costituiti da sistemi statici chiusi o adeguati sistemi a flusso continuo (7)(17). Le figure 1 e 2 mostrano rispettivamente esempi di apparecchi di flusso adatti all'incubazione del suolo e contenitori per biometria. Entrambi i tipi di sistemi di incubazione presentano vantaggi e limiti (7)(17).

È necessario disporre di un'attrezzatura standard da laboratorio, e in particolare:

— strumentazione analitica quale apparecchi per GLC, HPLC, TLC, compresi adeguati sistemi di rilevazione per l'analisi di sostanze radiomarcate e non radiomarcate, o il metodo di diluizione isotopica inversa;

— strumenti di identificazione (ad esempio: MS, GC-MS, HPLC-MS, RMN, ecc.);

— rivelatore a scintillazione a liquido;

— ossidatore per la combustione del materiale radioattivo;

— centrifuga;

— apparecchio per l'estrazione (per esempio tubi da centrifuga per l'estrazione a freddo ed estrattore di Soxhlet per l'estrazione continua sotto riflusso);

— strumentazione per la concentrazione di soluzioni ed estratti (ad es. evaporatore a rotazione);

— bagnomaria;

— apparecchio per miscelatura meccanica (ad es. impastatrice, miscelatore a rotazione).

▼B

I reagenti chimici usati sono, ad esempio:

— NaOH, grado analitico, 2 mol· dm^{-3}, o un'altra base adeguata (ad es. KOH, etanolammina);

— H_2SO_4, grado analitico, 0,05 mol· dm^{-3};

— glicole etilenico, grado analitico;

— materiali assorbenti solidi, quali calce sodata e tappi in poliuretano;

— solventi organici, grado analitico, quali acetone, metanolo, ecc.;

— liquido per scintillazione.

1.8.2 **Applicazione della sostanza di prova**

Per introdurre e distribuire la sostanza di prova nel suolo la si può sciogliere in acqua (distillata o deionizzata) o, se necessario, in minime quantità di acetone o di altri solventi organici (6) nei quali la sostanza di prova sia sufficientemente solubile e stabile. La quantità di solvente scelto non deve però esercitare un'influenza significativa sull'attività microbica del suolo (vedi sezioni 1.5 e 1.9.2-1.9.3). Va evitato l'impiego di solventi che inibiscono l'attività microbica, quali il cloroformio, il diclorometano e altri solventi alogenati.

La sostanza di prova può essere aggiunta anche in forma solida, ad es. mista a sabbia quarzosa (6) o in un piccolo sottocampione del suolo sperimentale che sia stato asciugato all'aria e sterilizzato. Se la sostanza di prova viene aggiunta con l'ausilio di un solvente, occorre permettere al solvente di evaporare prima di aggiungere il sottocampione arricchito al campione di suolo originale non sterile.

Per le sostanze chimiche generiche, che entrano nel suolo soprattutto attraverso i fanghi delle acque di scarico e le pratiche agricole, la sostanza di prova va prima aggiunta al fango, che viene poi introdotto nel campione di suolo (vedi sezioni 1.9.2 e 1.9.3).

Di norma non si consiglia l'impiego di prodotti formulati, che possono però costituire una valida alternativa, ad esempio, per le sostanze di prova scarsamente solubili.

1.8.3 **Suoli**

1.8.3.1 *Selezione del suolo*

Per determinare la via di trasformazione è possibile usare un suolo rappresentativo; è consigliabile impiegare un limo sabbioso, un limo fangoso, un limo glaciale o una sabbia limosa [secondo la classificazione FAO e USDA (18)] con un pH di 5,5-8,0, un contenuto di carbonio organico dello 0,5-2,5 % e una biomassa microbica pari ad almeno l'1 % del carbonio organico totale (10).

Per gli studi dei tassi di trasformazione occorre usare almeno tre suoli aggiuntivi che rappresentino una gamma di suoli attinenti. I suoli devono differire tra loro in quanto a contenuto di carbonio organico, pH, contenuto di argilla e biomassa microbica (10).

▼B

Tutti i suoli devono essere caratterizzati per lo meno per quanto concerne struttura (% di sabbia, % di limo, % di argilla) [secondo la classificazione FAO e USDA (18)], pH, capacità di scambio dei cationi, carbonio organico, peso specifico apparente, caratteristiche di ritenzione idrica ([1]) e biomassa microbica (solo per gli studi aerobici). Per l'interpretazione dei risultati possono essere utili ulteriori informazioni sulle proprietà del suolo. Per determinare le caratteristiche del suolo è possibile usare i metodi raccomandati nelle voci bibliografiche (19)(20)(21)(22)(23). La biomassa microbica va determinata utilizzando il metodo della respirazione indotta dal substrato (25)(26) o metodi alternativi (20).

1.8.3.2 *Raccolta, manipolazione e conservazione dei suoli*

Occorre fornire possibilmente informazioni dettagliate circa la storia del sito da cui è stato raccolto il suolo per il test. Tali dettagli comprendono il luogo esatto, la copertura vegetale, i trattamenti con sostanze chimiche, i trattamenti con fertilizzanti organici e inorganici, l'aggiunta di materiali biologici e altri tipi di contaminazione. I suoli trattati con la sostanza di prova o con i suoi analoghi strutturali nei precedenti quattro anni non vanno usati per gli studi sulla trasformazione (10)(15).

Il suolo deve essere raccolto di fresco sul campo (dall'orizzonte A o dallo strato superficiale di 20 cm) ad un tasso di umidità tale da facilitarne la setacciatura. Per suoli diversi da quelli provenienti dalle risaie, occorre evitare la raccolta di campioni durante o immediatamente dopo lunghi periodi (> 30 giorni) di siccità, gelo o inondazione (14). I campioni vanno trasportati in modo da ridurre al minimo l'alterazione del tasso di umidità del suolo e vanno tenuti al buio ma, per quanto possibile, con libero passaggio dell'aria. A tale scopo risulta generalmente adeguata una busta di polietilene con l'apertura allentata.

Il suolo deve essere trattato appena possibile dopo il campionamento. Occorre asportare la vegetazione, la fauna di maggiori dimensioni e le pietre, prima di passare il suolo attraverso un setaccio di 2 mm che rimuova le pietre, la fauna e i detriti delle piante di piccole dimensioni. Occorre evitare di essiccare e rompere eccessivamente il suolo prima della setacciatura (15).

Quando in inverno il campionamento sul campo risulta difficoltoso (suolo gelato o coperto da strati di neve), il campione può essere prelevato da un lotto di suolo conservato in serra sotto copertura vegetale (ad es. erba o miscugli erba-trifoglio). Sono di gran lunga preferibili gli studi con suoli appena raccolti dal campo, ma dovendo conservare il suolo raccolto e trattato prima di poter avviare lo studio, le condizioni di conservazione devono essere adeguate e limitate nel tempo (4 ± 2 °C per un massimo di tre mesi) per mantenere l'attività microbica ([2]). Istruzioni dettagliate circa la raccolta, la manipolazione e la conservazione dei suoli da usarsi per gli esperimenti di biotrasformazione sono reperibili in (8)(10)(15)(26)(27).

([1]) La caratteristica della ritenzione idrica di un suolo può essere misurata come capacità di campo, come capacità idrica di ritenuta o come tensione di aspirazione dell'acqua (pF). Per le spiegazioni, cfr. l'allegato 1. Nella relazione è necessario riferire se le caratteristiche di ritenzione idrica e il peso specifico apparente dei suoli sono stati determinati in campioni di campi indisturbati o in campioni disturbati (lavorati)

([2]) I risultati di recenti ricerche indicano che i suoli delle zone temperate possono essere conservati anche a - 20 °C per oltre tre mesi (28)(29) senza perdita significativa dell'attività microbica.

▼B

Prima che il suolo trattato venga usato per questo test, deve essere pre-incubato per consentire la germinazione e la rimozione dei semi, e per ristabilire l'equilibrio del metabolismo microbico successivamente al passaggio dalle condizioni di campionamento o conservazione alle condizioni di incubazione. Generalmente è ritenuto adeguato un periodo di pre-incubazione di 2-28 giorni in cui ci si avvicina alle condizioni di temperatura e umidità del test vero e proprio (15). Il tempo di conservazione e di pre-incubazione non deve superare complessivamente i tre mesi.

1.9 ESECUZIONE DEL TEST

1.9.1 **Condizioni**

1.9.1.1 *Temperatura*

Durante tutto il periodo del test, i suoli vanno incubati al buio a una temperatura costante rappresentativa delle condizioni climatiche del luogo in cui verranno usati o rilasciati. Una temperatura di 20 ± 2 °C è consigliata per tutte le sostanze sperimentali che possono raggiungere il suolo in climi temperati. La temperatura va monitorata.

Per le sostanze chimiche applicate o rilasciate in climi più freddi (ad es. nei paesi settentrionali, durante il periodo autunnale o invernale), occorre incubare anche altri campioni di suolo a una temperatura inferiore (ad es. 10 ± 2 °C).

1.9.1.2 *Tenore di umidità*

Per i test di trasformazione in condizioni aerobiche, il tenore di umidità del suolo ([1]) deve essere regolato e mantenuto a un pF compreso fra 2,0 e 2,5 (3). Il tenore di umidità del suolo si esprime come massa di acqua per massa di suolo secco e va controllato regolarmente (ad es. a intervalli di 2 settimane) mediante pesatura dei contenitori di incubazione; eventuali perdite di acqua vanno compensate con un'aggiunta di acqua (preferibilmente acqua corrente filtrata in condizioni sterili). Nel fare questo occorre prestare attenzione in modo da prevenire o ridurre al minimo le perdite di sostanza di prova e/o dei prodotti di trasformazione per volatilizzazione e/o fotodegradazione.

Per i test di trasformazione in condizioni anaerobiche e in risaia, il suolo va saturato di acqua mediante inondazione.

1.9.1.3 *Condizioni aerobiche di incubazione*

Nei sistemi a flusso continuo le condizioni aerobiche sono mantenute mediante afflusso intermittente o ventilazione continua con aria umidificata. Nei contenitori per studi biometrici, lo scambio dell'aria viene mantenuto per diffusione.

1.9.1.4 *Condizioni aerobiche sterili*

Per ottenere informazioni sulla rilevanza della trasformazione abiotica di una sostanza di prova, i campioni di suolo possono essere sterilizzati (per i metodi di sterilizzazione, cfr. i riferimenti bibliografici 16 e 29), trattati con sostanza di prova sterile (ad es. aggiunta di soluzione attraverso un filtro sterile) e aerati con aria sterile umidificata come descritto nella sezione 1.9.1.3. Per i terreni da risaia, suolo e acqua vanno sterilizzati e l'incubazione va effettuata come descritto nella sezione 1.9.1.6.

([1]) Per areare e nutrire adeguatamente la microflora del suolo, il suolo non deve essere né troppo umido né troppo secco. I tenori di umidità raccomandati per una crescita microbica ottimale sono compresi fra il 40 e il 60 % della capacità idrica di ritenuta e fra 0,1 e 0,33 bar (6). Quest'ultima gamma di valori equivale a una gamma pF di 2,0-2,5. Nell'allegato 2 sono indicati i tenori di umidità tipici di vari tipi di suoli.

▼B

1.9.1.5 *Condizioni anaerobiche di incubazione*

Per ottenere e mantenere condizioni anaerobiche, il suolo trattato con la sostanza di prova e incubato in condizioni aerobiche per 30 giorni o un tempo di dimezzamento o DT_{50} (il tempo più breve) viene successivamente impregnato d'acqua (strato di acqua di 1-3 cm) e il sistema di incubazione viene sommerso con un gas inerte (ad es. azoto o argon) ([1]). Il sistema di prova deve consentire di effettuare anche misurazioni ad es. del pH, della concentrazione di ossigeno e del potenziale di ossidoriduzione e comprendere dispositivi di cattura dei prodotti volatili. Il sistema a biometro deve essere chiuso in modo da evitare l'ingresso di aria per diffusione.

1.9.1.6 *Condizioni di incubazione in risaia*

Per studiare la trasformazione nei suoli allagati da risaia, il suolo viene allagato con uno strato di acqua di circa 1-5 cm e la sostanza di prova viene applicata alla fase acquosa (9). Si raccomanda che il suolo sia profondo almeno 5 cm. Il sistema è ventilato con aria in condizioni aerobiche. pH, concentrazione di ossigeno e potenziale di ossidoriduzione dello strato acquoso vanno monitorati e indicati nella relazione. Prima di iniziare gli studi sulla trasformazione il suolo va tenuto in pre-incubazione per almeno due settimane (cfr. sezione 1.8.3.2).

1.9.1.7 *Durata del test*

Gli studi sulla velocità e la via di trasmissione non dovrebbero di norma superare i 120 giorni ([2]) (3)(6)(8), poiché, superato questo lasso di tempo, è molto probabile che in un sistema artificiale di laboratorio, isolato dalla naturale ricostituzione, si verifichi una riduzione dell'attività microbica. Se necessario, per caratterizzare la diminuzione della sostanza di prova e la formazione e la diminuzione dei principali prodotti di trasformazione, è possibile continuare gli studi per periodi più lunghi (ad es. 6 o 12 mesi) (8). In caso di prolungamento dei tempi di incubazione occorre dare motivazione nella relazione, aggiungendo i dati delle misurazioni della biomassa durante e alla fine dei periodi di incubazione.

1.9.2 **Esecuzione del test**

In ciascun contenitore per incubazione si sistemano circa 50-200 g di suolo (peso a secco) (cfr. figure 1 e 2 nell'allegato 3), che viene trattato con la sostanza di prova utilizzando uno dei metodi descritti nella sezione 1.8.2. Se si impiegano solventi organici per l'applicazione della sostanza di prova, è necessario eliminarli dal suolo per evaporazione. Il suolo va poi miscelato accuratamente con una spatola e/o scuotendo il contenitore. Se si conduce lo studio in condizioni di risaia, occorre miscelare accuratamente acqua e suolo dopo l'applicazione della sostanza di prova. Allo scopo di controllare la distribuzione uniforme della sostanza di prova, questa va ricercata analizzando piccole quantità (ad es. 1 g) dei suoli trattati. Per un metodo alternativo, cfr. sotto.

([1]) Le condizioni aerobiche sono dominanti nei suoli superficiali e anche negli strati sotto la superficie, come dimostrato dal progetto di ricerca sponsorizzato dall'UE [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden]. Condizioni anaerobiche possono verificarsi solo occasionalmente durante l'inondazione dei suoli dopo forti piogge o quando le risaie vengono sommerse.

([2]) Gli studi aerobici possono essere conclusi molto prima di 120 giorni, a condizione che al momento della conclusione siano state raggiunte con certezza la via definitiva di trasformazione e la massima mineralizzazione. È possibile concludere il test dopo 120 giorni o quando almeno il 90 % della sostanza di prova è trasformata, ma solo se si è formato almeno il 5 % di CO_2.

▼B

Il tasso di concentrazione delle sostanze per il trattamento deve corrispondere al tasso più elevato di applicazione di un prodotto fitosanitario indicato nelle istruzioni per l'uso e con incorporazione uniforme a una profondità adeguata nel terreno del campo (ad es. strato superficiale di 10 cm ([1]) di suolo). Per esempio, per le sostanze chimiche da applicare sul fogliame o sul suolo senza incorporazione, la profondità corretta per calcolare quanta sostanza chimica occorre aggiungere a ciascun contenitore è 2,5 cm. Per le sostanze chimiche da incorporare nel suolo, la profondità corretta è la profondità di incorporazione specificata nelle istruzioni per l'uso. Per le sostanze chimiche generiche, il tasso di applicazione va calcolato sulla base della via di somministrazione più rilevante; per esempio, quando la principale via di somministrazione nel suolo sono i fanghi di acque reflue, la sostanza chimica va dosata nel fango ad una concentrazione che rispecchi il normale carico di fanghi nei suoli agricoli. Se tale concentrazione non è sufficientemente elevata per identificare i principali prodotti di trasformazione, può essere utile l'incubazione di campioni di suolo separati con tenore più elevato, ma è importante evitare di eccedere nelle quantità per non avere reazioni che influiscono sulle funzioni microbiche (cfr. sezioni 1.5 e 1.8.2).

In alternativa è possibile trattare con la sostanza di prova un lotto più esteso (ad es. di 1-2 kg), accuratamente mescolato in un miscelatore adeguato e poi diviso in porzioni più piccole di 50-200 g nei contenitori per l'incubazione (per esempio usando inquartatori di campioni). Allo scopo di controllare la distribuzione uniforme della sostanza di prova, questa va ricercata analizzando piccole quantità (ad es. 1 g) del lotto di suolo trattato. Una procedura di questo tipo è preferibile, in quanto consente una distribuzione più uniforme della sostanza di prova nel suolo.

Anche i campioni di suolo non trattati vengono incubati nelle stesse condizioni (aerobiche) dei campioni trattati con la sostanza di prova. Tali campioni sono usati per le misurazioni della biomassa durante e alla fine degli studi.

Quando la sostanza di prova viene applicata al suolo disciolta in uno o più solventi organici, occorre incubare anche campioni di suolo trattati con la stessa quantità di solvente/i mantenendo le stesse condizioni (aerobiche) utilizzate per i campioni trattati con la sostanza di prova. I campioni trattati vengono usati per le misurazioni della biomassa all'inizio, durante e alla fine degli studi per controllare gli eventuali effetti del/i solvente/i sulla biomassa microbica.

I contenitori con il suolo trattato vengono collegati al sistema a flusso continuo descritto nella figura 1 o chiusi con la colonna di assorbimento di cui alla figura 2 (cfr. allegato 3).

([1]) Calcolo della concentrazione iniziale su una base d'area usando la seguente equazione:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{l[m] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d[kg_{soil}/m^3]}$$

C_{soil} = concentrazione iniziale nel suolo [mg· kg]
A = tasso di applicazione [kg· ha^{-1}]; l = spessore dello strato di suolo nel campo [m]; d = peso specifico apparente secco del suolo [kg· m^{-3}].
Di massima, con un tasso di applicazione di 1 kg· ha^{-1} si ottiene una concentrazione nel suolo di circa 1 mg· kg^{-1} in uno strato di 10 cm (presupponendo un peso specifico apparente di 1 g· cm^{-3}).

▼B

1.9.3 **Campionamento e misurazione**

I contenitori doppi per l'incubazione vengono rimossi ad opportuni intervalli di tempo per estrarre i campioni di suolo con solventi appropriati di diversa polarità che vengono poi analizzati alla ricerca della sostanza di prova e/o di prodotti di trasformazione. Uno studio ben disegnato prevede un numero sufficiente di contenitori per consentire di sacrificare due contenitori durante ciascun campionamento. Inoltre, le soluzioni di assorbimento o i materiali solidi di assorbimento vengono rimossi a vari intervalli di tempo (intervalli di 7 giorni durante il primo mese e, successivamente, a intervalli di 17 giorni) durante e alla fine dell'incubazione di ciascun campione e analizzati alla ricerca di prodotti volatili. Oltre a un campione di suolo prelevato subito dopo l'applicazione (campione del giorno 0) occorre prevedere almeno altri 5 momenti di campionamento. Gli intervalli di tempo vanno scelti in modo da poter stabilire una costante di diminuzione della sostanza di prova e costanti di formazione e diminuzione dei prodotti di trasformazione (ad es. giorni 0, 1, 3, 7; settimane 2, 3; mesi 1, 2, 3, ecc.).

Quando si utilizza una sostanza di prova ^{14}C-marcata, la radioattività non estraibile verrà quantificata per combustione e per ogni intervallo di campionamento verrà calcolato un bilancio di massa.

Nel caso di incubazione anaerobica e in risaia, le fasi di suolo e d'acqua vengono analizzate insieme per ricercare la sostanza di prova e i prodotti di trasformazione, oppure separate per filtrazione o centrifugazione prima dell'estrazione e dell'analisi.

1.9.4 **Test opzionali**

Studi aerobici, non sterili, ad altre temperature e diverse concentrazioni di umidità del suolo possono risultare utili per stimare gli effetti della temperatura e dell'umidità del suolo sulla velocità di trasformazione di una sostanza di prova e/o dei suoi prodotti di trasformazione nel suolo.

È possibile tentare un'ulteriore caratterizzazione della radioattività non estraibile usando, ad esempio, l'estrazione fluida supercritica.

2. **DATI**

2.1 TRATTAMENTO DEI RISULTATI

Le quantità delle sostanza di prova, dei prodotti di trasformazione e delle sostanze volatili (solo in %) e non estraibili vanno indicate come % della concentrazione iniziale applicata e, ove pertinente, in $mg \cdot kg^{-1}$ di suolo (in base al peso secco del suolo) per ciascun intervallo di campionamento. È necessario indicare in percentuale l'equilibrio di massa della concentrazione iniziale applicata per ciascun intervallo di campionamento. La presentazione grafica delle concentrazioni della sostanza di prova in funzione del tempo consentirà una stima del suo tempo di dimezzamento o DT_{50} di trasformazione. È inoltre necessario identificare i principali prodotti di trasformazione, rappresentandone graficamente le concentrazioni in funzione del tempo per evidenziarne la velocità di formazione e di diminuzione. Per principale prodotto di trasformazione si intende qualsiasi prodotto che rappresenti $\geq$ 10 % della dose applicata in qualsiasi momento nel corso dello studio.

I prodotti volatili intrappolati forniscono una certa indicazione del potenziale di volatilità di una sostanza di prova e dei suoi prodotti di trasformazione dal suolo.

▼B

È possibile calcolare in modo più accurato i tempi di dimezzamento o i valori DT_{50} e, se pertinente, i valori DT_{75} e DT_{90} utilizzando adeguati modelli cinetici. Il tempo di dimezzamento e i valori DT_{50} vanno riportati nella relazione insieme alla descrizione del modello usato, dell'ordine della cinetica e del coefficiente di determinazione (r^2). Si preferisce la cinetica di primo ordine, a meno che $r^2 < 0,7$. Se del caso, i calcoli vanno applicati anche ai principali prodotti di trasformazione. Nei riferimenti bibliografici da 31 a 35 sono descritti esempi di modelli adeguati.

Nel caso di studi sulla velocità eseguiti a diverse temperature, le velocità di trasformazione vanno descritte come funzione della temperatura all'interno della gamma di temperature sperimentali, usando il rapporto di Arrhenius della formula:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or } lnk = 1nA - \frac{B}{T},$$

dove ln A e B sono costanti di regressione, rispettivamente, dall'intercetta e dalla pendenza di una retta best fit generata dalla regressione lineare di ln k rispetto a 1/T, k è la velocità costante alla temperatura T e T è la temperatura in Kelvin. Occorre prestare attenzione alla gamma limitata di temperature in cui il rapporto di Arrhenius sarà valido nel caso la trasformazione sia governata dall'azione microbica.

2.2 VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Sebbene gli studi vengano eseguiti in un sistema artificiale di laboratorio, i risultati consentiranno di stimare la velocità di trasformazione della sostanza di prova, oltre che il tasso di formazione e diminuzione dei prodotti di trasformazione in condizioni paragonabili a quelle di campo (36)(37).

Lo studio della via di trasformazione di una sostanza di prova fornisce informazioni sul modo in cui la sostanza applicata viene modificata strutturalmente nel suolo da reazioni chimiche e microbiche.

3. **RELAZIONE**

RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL TEST

La relazione sull'esecuzione del test deve contenere le seguenti informazioni specifiche:

Sostanza di prova:

— denominazione comune, nome chimico, numero CAS, formula di struttura [indicante la(e) posizione(i) della(e) marcatura(e) quando si utilizza materiale radiomercato] e proprietà fisico-chimiche pertinenti (cfr. sezione 1.5);

— purezza (impurità) della sostanza di prova;

— purezza radiochimica della sostanza chimica marcata e attività specifica (ove pertinente).

Sostanze di riferimento:

— nome chimico e struttura delle sostanze di riferimento usate per la caratterizzazione e/o l'identificazione dei prodotti di trasformazione.

Suoli sperimentali:

— particolari riguardanti il sito di raccolta;

— data e procedura di campionamento dei suoli;

▼B

— proprietà dei suoli, quali pH, contenuto di carbonio organico, tessitura (% sabbia, % limo, % argilla), capacità di scambio dei cationi, peso specifico apparente, caratteristiche di ritenzione idrica e biomassa microbica;

— durata della conservazione del suolo e condizioni di conservazione (se pertinente).

Condizioni del test:

— date di esecuzione degli studi;

— quantità di sostanza di prova applicata;

— solventi usati e metodo di applicazione per la sostanza di prova;

— peso del suolo trattato inizialmente e campionato a ciascun intervallo per essere analizzato;

— descrizione del sistema di incubazione;

— tassi di flusso dell'aria (solo per i sistemi a flusso continuo);

— temperatura dell'ambiente sperimentale;

— tasso di umidità del suolo durante l'incubazione;

— biomassa microbica all'inizio, durante e alla fine degli studi aerobici;

— pH, concentrazione di ossigeno e potenziale di ossidoriduzione all'inizio, durante e alla fine degli studi anaerobici e in risaia;

— metodo/i di estrazione;

— metodi per la quantificazione e l'identificazione della sostanza di prova e dei principali prodotti di trasformazione nel suolo e nei materiali di assorbimento;

— numero di replicati e numero di controlli.

Risultati:

— risultato della determinazione dell'attività microbica;

— ripetibilità e sensibilità dei metodi analitici usati;

— tassi di recupero (i valori % per uno studio valido sono indicati nella sezione 1.7.1);

— tabelle dei risultati espressi in % della dose iniziale applicata e, ove pertinente, in $mg \cdot kg^{-1}$ di suolo (base di peso secco);

— bilancio di massa durante e alla fine degli studi;

— caratterizzazione della radioattività o dei residui non estraibili nel suolo;

— quantificazione del CO^2 e di altre sostanze volatili rilasciate;

— grafici delle concentrazioni nel suolo in funzione del tempo riferiti alla sostanza di prova e, ove pertinente, ai principali prodotti di trasformazione;

— tempo di dimezzamento o DT_{50}, DT_{75} e DT_{90} della sostanza di prova e, ove pertinente, dei principali prodotti di trasformazione, compresi gli intervalli di confidenza;

▼B

— stima della velocità di degradazione abiotica in condizioni sterili;

— una valutazione della cinetica di trasformazione per la sostanza di prova e, ove pertinente, per i principali prodotti di trasformazione;

— vie di trasformazione proposte, ove pertinente;

— discussione e interpretazione dei risultati;

— dati originali (cioè cromatogrammi campione, calcoli campione dei tassi di trasformazione e metodi usati per identificare i prodotti di trasformazione).

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) Unione europea (UE) (1995). 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. Allegato II, parte A ed allegato III, parte A: Destino e comportamento nell'ambiente.

(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden — Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

(6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality — Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil — Part 1: Aerobic conditions.

(7) ISO 14239 (1997). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(9) MAFF — Japan 2000 — Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil — Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

(10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley — VCH (1998).

(13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984)

(14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981)

▼B

(15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(16) Allegato V della direttiva 67/548/CEE.

(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

(23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215-221.

(25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

(26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.

(27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and biotransformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105-120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197-200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181-199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In «Environmental Dynamics of Pesticides». R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135-172.

(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 39, 188-204.

(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 33,47-60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24,1032-1041.

(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

▼B

ALLEGATO 1

TENSIONE DELL'ACQUA, CAPACITÀ DI CAMPO (FC) E CAPACITÀ DI RITENUTA IDRICA (WHC) [1]

Altezza della colonna d'acqua [cm]	pF [a]	bar [b]	Note
10^7	7	10^4	Suolo secco
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Punto di appassimento
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3{,}3 \cdot 10^2$	2,5	0,33 [c]	Gamma della capacità di campo [d] imazione)
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (approssimazione)
1	0	0,001	Suolo saturato d'acqua

[a] pF = log di cm di colonna d'acqua.
[b] 1 bar = 10^5 Pa.
[c] Corrisponde a un contenuto idrico approssimativo del 10 % in sabbia, 35 % in limo e 45 % in argilla.
[d] La capacità di campo non è costante ma varia con il tipo di suolo fra pF 1,5 e 2,5.

La *tensione dell'acqua* si misura in cm di colonna d'acqua o in bar. A motivo dell'ampia gamma di tensione di aspirazione viene espressa semplicemente come valore pF, che è equivalente al logaritmo di cm di colonna d'acqua.

La *capacità di campo* si definisce come la quantità d'acqua che può essere conservata contro la gravità da parte di un suolo naturale 2 giorni dopo un periodo di pioggia prolungato o dopo irrigazione sufficiente. Viene determinata in suolo indisturbato in situ nel campo. La misurazione, pertanto, non è applicabile ai campioni di suolo disturbati di laboratorio. I valori FC determinati in suoli disturbati possono presentare notevoli varianze sistematiche.

La *capacità di ritenuta idrica* (WHC) si definisce in laboratorio con suolo indisturbato e disturbato saturando una colonna di suolo con acqua per trasporto capillare. È particolarmente utile per i suoli disturbati e può essere fino al 30 % superiore alla capacità di campo (1). Inoltre, sperimentalmente è più semplice da determinare rispetto ai valori affidabili diFC.

Note

[1] Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

ALLEGATO 2

CONTENUTO DI UMIDITÀ DEL SUOLO (g di acqua per 100 g di suolo secco) DI VARI TIPI DI SUOLO DA DIVERSI PAESI

Tipo di suolo	Paese	Contenuto di umidità del suolo a		
		WHC ([1])	pF = 1,8	pF = 2,5
Sabbia	Germania	28,7	8,8	3,9
Sabbia limosa	Germania	50,4	17,9	12,1
Sabbia limosa	Svizzera	44,0	35,3	9,2
Limo fangoso	Svizzera	72,8	56,6	28,4
Limo argilloso	Brasile	69,7	38,4	27,3
Limo argilloso	Giappone	74,4	57,8	31,4
Limo sabbioso	Giappone	82,4	59,2	36,0
Limo fangoso	USA	47,2	33,2	18,8
Limo sabbioso	USA	40,4	25,2	13,3

([1]) Capacità di ritenuta idrica.

▼B

ALLEGATO 3

Figura 1

Esempio di apparecchio a flusso continuo per studiare la trasformazione delle sostanze chimiche nel suolo ([1]) ([2])

1: valvola ad ago

2: bottiglia di lavaggio contenente acqua

3: ultramembrana (solo condizioni sterili), dimensione dei pori 0,2 µm

4: contenitore per metabolismo del suolo (impregnato d'acqua solo per le condizioni anaerobiche e di risaia;)

5: trappola a etilenglicole per composti organici volatili

6: trappola ad acido solforico per composti volatili alcalini

7, 8: trappola a idrossido di sodio per CO_2 e altre sostanze volatili acide

9: flussometro.

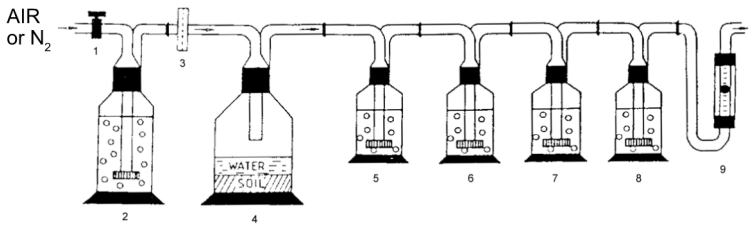
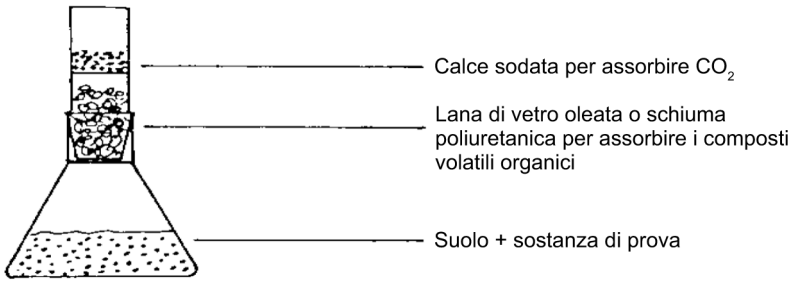


Figura 2

Esempio di contenitori per sistemi a biometro per studiare la trasformazione delle sostanze chimiche nel suolo ([3])



([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

([2]) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

C.24. TRASFORMAZIONE AEROBICA E ANAEROBICA NEI SISTEMI SEDIMENTOSI ACQUATICI

1. METODO

Questo metodo di prova corrisponde al TG 308 (2002) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Le sostanze chimiche possono penetrare nelle acque superficiali, basse o profonde, per applicazione diretta, deriva di sostanze nebulizzate, deflusso, drenaggio, smaltimento di rifiuti, effluenti industriali, domestici o agricoli e deposizione atmosferica. Questo metodo di prova descrive un metodo di laboratorio per determinare la trasformazione aerobica e anaerobica di sostanze chimiche organiche nei sistemi sedimentosi acquatici. Esso si basa su linee guida esistenti (1)(2)(3)(4)(5)(6). Un gruppo di lavoro OCSE sulla selezione dei suoli e dei sedimenti, tenuto a Belgirate nel 1995 (7), ha definito, in particolare, il numero e il tipo di sedimenti da usare per questo test e ha formulato alcune raccomandazioni sulla raccolta, la manipolazione e la conservazione di campioni di sedimento, sulla base di norme ISO (8). Questi studi sono necessari per esaminare le sostanze chimiche che sono direttamente introdotte nell'acqua o che hanno la possibilità di raggiungere l'ambiente acquatico tramite le vie sopra menzionate.

I sistemi sedimentosi acquatici naturali hanno speso condizioni aerobiche nella fase acquosa superiore. Lo strato superficiale del sedimento può essere aerobico o anaerobico, mentre il sedimento più profondo è solitamente anaerobico. Per tenere conto di tutte queste possibilità, il presente documento descrive prove sia aerobiche, sia anaerobiche. La prova aerobica simula una colonna d'acqua aerobica sopra uno strato di sedimento aerobico sotto il quale si trova un gradiente anaerobico. La prova anaerobica simula un sistema acqua-sedimento completamente anaerobico. Vi sono altri metodi utilizzabili in circostanze nelle quali occorre scostarsi significativamente da queste raccomandazioni, per esempio impiegando nuclei di sedimento intatti o sedimenti che potrebbero essere stati esposti alla sostanza di prova (9).

1.2 DEFINIZIONI

In tutti i casi vanno applicate le unità del sistema internazionale (SI).

Sostanza di prova: qualsiasi sostanza, sia un composto progenitore che i relativi prodotti di trasformazione.

Prodotti di trasformazione: tutte le sostanze derivate da reazioni di trasformazione biotica o abiotica della sostanza di prova, compresi CO_2 e i residui non estraibili.

Residui non estraibili: composti presenti nel suolo, nelle piante o negli animali, che dopo estrazione persistono nella matrice sotto forma di sostanza progenitrice o di uno o più dei suoi metaboliti. Il metodo di estrazione non deve alterare in modo considerevole i composti stessi o la struttura della matrice. La natura del legame può essere chiarita, in parte, mediante metodi di estrazione che alterano la matrice e sofisticate tecniche analitiche. Finora, ad esempio, sono stati individuati in questo modo legami ionici covalenti e di assorbimento/adsorbimento, come pure le catture. In generale, la formazione di residui non estraibili riduce la bioaccessibilità e la biodisponibilità in maniera significativa (10) [modificato da IUPAC 1984 (11)].

▼B

Trasformazione aerobica: (ossidante): reazioni che si verificano in presenza di ossigeno molecolare (12).

Trasformazione anaerobica: (riducente): reazioni che si verificano in assenza di ossigeno molecolare (12).

Acque naturali: acque superficiali ottenute da laghi, fiumi, ruscelli, ecc.

Sedimento: miscela di costituenti chimici inorganici e organici, questi ultimi contenenti composti ad elevato contenuto di carbonio e azoto e di elevata massa molecolare. Viene depositato dall'acqua naturale con cui forma un'interfaccia.

Mineralizzazione: degradazione completa di un composto organico in CO_2 e H_2O in condizioni aerobiche, e in CH_4, CO_2 e H_2O in condizioni anaerobiche. Nel contesto del presente metodo di prova, quando viene impiegato un composto radiomarcato, la mineralizzazione rappresenta la degradazione di una molecola, durante la quale un atomo di carbonio marcato viene ossidato o ridotto in maniera quantitativa, con rilascio della quantità appropriata di $^{14}CO_2$ o $^{14}CH_4$, a seconda dei casi.

Tempo di dimezzamento: $t_{0,5}$: il tempo occorrente per la trasformazione del 50 % di una sostanza di prova, quando la trasformazione può essere descritta mediante cinetica di primo ordine; essa è indipendente dalla concentrazione iniziale.

DT_{50} (Tempo di scomparsa 50): tempo entro cui la concentrazione iniziale della sostanza di prova viene ridotta del 50 %.

DT_{75} (Tempo di scomparsa 75): tempo entro cui la concentrazione iniziale della sostanza di prova viene ridotta del 75 %.

DT_{90} (Tempo di scomparsa 90): tempo entro cui la concentrazione iniziale della sostanza di prova viene ridotta del 90 %.

1.3 SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Per identificare e determinare quantitativamente i prodotti di trasformazione mediante metodi spettroscopici e cromatografici vengono utilizzate sostanze di riferimento.

1.4 INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA DI PROVA

Per misurare la velocità di trasformazione è possibile utilizzare una sostanza di prova non marcata o marcata con isotopo, ma si preferisce il materiale marcato. Il materiale marcato è essenziale per lo studio delle vie di trasformazione e per determinare il bilancio di massa. È consigliata la marcatura con ^{14}C, ma possono anche rivelarsi utili altri isotopi, quali ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. La marcatura va posizionata nei limiti del possibile nella parte o nelle parti più stabili della molecola ([1]). La purezza chimica e/o radiochimica della sostanza di prova deve essere almeno pari al 95 %.

Prima di eseguire la prova devono essere disponibili le seguenti informazioni sulla sostanza di prova:

a) solubilità in acqua (Metodo A.6);

b) solubilità in solventi organici;

c) pressione di vapore (Metodo A.4) e costante della legge di Henry;

([1]) Se, per esempio, la sostanza contiene un anello, la marcatura va effettuata su questo anello; se la sostanza di prova contiene due o più anelli, potrebbero rilevarsi necessari più studi per determinare il destino di ciascun anello marcato e per ottenere informazioni adeguate sulla formazione dei prodotti di trasformazione.

▼B

d) coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua (Metodo A.8);

e) coefficiente di adsorbimento (K_d, K_f o K_{oc}, a seconda dei casi) (Metodo C.18);

f) idrolisi (Metodo C.7);

g) costante di dissociazione (pK_a) [linee guida OCSE 112] (13);

h) struttura chimica della sostanza di prova ed eventuale posizione della marcatura isotopica.

Nota. Va indicata la temperatura alla quale vengono effettuate queste misurazioni.

Altre informazioni utili possono comprendere i dati sulla tossicità della sostanza di prova nei confronti di microrganismi, i dati sulla biodegradabilità rapida e/o intrinseca, e i dati sulla trasformazione aerobica e anaerobica nel suolo.

Dovrebbero essere disponibili metodi analitici (compresi i metodi di estrazione e depurazione) per l'identificazione e la determinazione quantitativa della sostanza di prova e dei suoi prodotti di trasformazione nell'acqua e nel sedimento (vedi sezione 1.7.2).

1.5 PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA

Il metodo descritto in questo test utilizza un sistema sedimentoso acquatico aerobico e uno anaerobico (vedi allegato 1) che consente:

i) la misurazione della velocità di trasformazione della sostanza di prova in un sistema acqua-sedimento;

ii) la misurazione della velocità di trasformazione della sostanza di prova nel sedimento,

iii) la misurazione della velocità di mineralizzazione della sostanza di prova e/o dei suoi prodotti di trasformazione (quando viene usata una sostanza di prova marcata con ^{14}C),

iv) l'identificazione e la determinazione quantitativa dei prodotti di trasformazione della fase acquosa e di quella sedimentosa, compreso il bilancio di massa (quando viene usata una sostanza di prova marcata),

v) la misurazione della distribuzione della sostanza di prova e dei suoi prodotti di trasformazione tra le due fasi durante il periodo di incubazione al buio (per evitare ad esempio la fioritura delle alghe) a temperatura costante. I tempi di dimezzamento e i valori di DT_{50}, DT_{75} e DT_{90} vengono determinati quando i dati lo dovessero consigliare, ma non vanno estrapolati di molto oltre l'intervallo sperimentale (vedi sezione 1.2).

Per ciascuno degli studi aerobico e anaerobico occorrono almeno due sedimenti con le rispettive acque (7). In determinati casi occorre però utilizzare più di due sedimenti acquatici, ad esempio nel caso di una sostanza chimica che può essere presente in ambienti di acqua dolce e/o in ambienti marini.

▼B

1.6 APPLICABILITÀ DEL TEST

Il metodo è generalmente applicabile alle sostanze chimiche (marcate o non marcate) per le quali è noto un metodo analitico sufficientemente accurato e sensibile. Esso è applicabile a composti leggermente volatili, non volatili, idrosolubili o scarsamente idrosolubili. Il test non va applicato a sostanze chimiche che presentano elevata volatilità in acqua (ad esempio fumiganti, solventi organici), che non possono pertanto essere tenute in acqua e/o nel sedimento nelle condizioni sperimentali del presente test.

Il metodo è stato applicato finora per studiare la trasformazione di sostanze chimiche in acque dolci e sedimenti, ma in linea di principio può anche essere applicato a sistemi estuariali o marini. Esso non è invece idoneo alla simulazione delle condizioni di acqua corrente (ad esempio nei fiumi) o di mare aperto.

1.7 CRITERI DI QUALITÀ

1.7.1 **Recupero**

L'estrazione e l'analisi di campioni di acqua e sedimento, perlomeno in duplicato, subito dopo l'aggiunta della sostanza di prova, forniscono una prima indicazione della ripetibilità del metodo analitico e dell'uniformità della procedura di applicazione per la sostanza di prova. Le percentuali di recupero per gli stadi successivi degli esperimenti sono basate sui rispettivi bilanci di massa (quando viene usato materiale marcato) e dovrebbero essere comprese tra 90 % e 110 % per le sostanze chimiche marcate (6) e tra 70 % e 110 % per le sostanze chimiche non marcate.

1.7.2 **Ripetibilità e sensibilità del metodo analitico**

La ripetibilità del metodo analitico (esclusa l'efficienza dell'estrazione iniziale) utilizzato per quantificare la sostanza di prova e i prodotti di trasformazione può essere controllata mediante un'analisi in duplicato dello stesso estratto dei campioni di acqua o sedimento, incubati sufficientemente a lungo per consentire la formazione di prodotti di trasformazione.

Il limite di rivelabilità del metodo analitico per la sostanza di prova e i prodotti di trasformazione deve essere pari ad almeno 0,01 mg· kg^{-1} in acqua o sedimento (come sostanza di prova) o all'1 % della quantità iniziale applicata a un sistema di prova, se minore del precedente. Va anche specificato il limite di quantificazione.

1.7.3 **Accuratezza dei dati sulla trasformazione**

L'analisi di regressione delle concentrazioni della sostanza di prova in funzione del tempo fornisce dati adeguati sull'accuratezza della curva di trasformazione e consente di calcolare gli intervalli di confidenza per i tempi di dimezzamento (in caso di cinetica del pseudo primo ordine) o i valori di DT_{50} e, se del caso, DT_{75} e DT_{90}.

1.8 DESCRIZIONE DEL METODO

1.8.1 **Sistema di prova e attrezzatura**

Lo studio va eseguito in contenitori di vetro (ad esempio bottiglie, provette da centrifuga) salvo quando dati preliminari (quali il coefficiente di ripartizione n-ottanolo-acqua, i dati di assorbimento/adsorbimento, ecc.) indicano che la sostanza di prova può aderire al vetro, nel qual caso potrebbe essere necessario prendere in considerazione un materiale alternativo (ad esempio teflon). Se è noto che la sostanza di prova aderisce al vetro, può essere possibile ovviare al problema mediante uno o più dei metodi seguenti:

▼B

— determinazione della massa della sostanza di prova e dei prodotti di trasformazione assorbiti sul vetro;

— lavaggio con solvente di tutta la vetreria al termine della prova;

— impiego di prodotti formulati (vedi anche sezione 1.9.2);

— uso di una quantità maggiore di cosolvente per l'aggiunta della sostanza di prova al sistema; l'eventuale cosolvente impiegato deve essere tale da non sottoporre a solvolisi la sostanza di prova.

Gli allegati 2 e 3 riportano esempi di attrezzature di prova tipiche, ossia, rispettivamente, a flusso continuo e con sistema a biometro (14). Altri sistemi ad incubazione utili sono descritti nel riferimento bibliografico 15. L'attrezzatura sperimentale deve essere progettata in modo tale da consentire lo scambio di aria o azoto e la cattura dei prodotti volatili. Le sue dimensioni devono essere tali da soddisfare i requisiti del test (vedi sezione 1.9.1). La ventilazione può essere garantita mediante un leggero gorgogliamento o mediante il passaggio di aria o azoto sopra la superficie dell'acqua. In quest'ultimo caso può essere consigliabile agitare leggermente l'acqua dall'alto, per migliorare la distribuzione dell'ossigeno o dell'azoto nell'acqua. Non va impiegata aria priva di CO_2 che potrebbe portare all'aumento del pH dell'acqua. In entrambi i casi è bene evitare se possibile di disturbare il sedimento. Le prove su sostanze chimiche leggermente volatili vanno effettuate in un sistema a biometro con leggera agitazione della superficie dell'acqua. Si possono anche usare recipienti chiusi con uno spazio di testa di aria atmosferica o azoto e fiale interne per la cattura dei prodotti volatili (16). Nella prova aerobica il gas contenuto nello spazio di testa va scambiato ad intervalli regolari per compensare il consumo di ossigeno ad opera della biomassa.

Come trappole idonee per la cattura di prodotti di trasformazione volatili si possono impiegare, senza però alcuna limitazione, soluzioni da 1 $mol \cdot dm^{-3}$ di idrossido di potassio o idrossido di sodio per l'anidride carbonica ([1]), e glicole etilenico, etanolammina o paraffina al 2 % in xilene per i composti organici. Le sostanze volatili formate in condizioni anaerobiche, quali metano, possono essere raccolte per esempio mediante setacci molecolari. Tali sostanze possono ad esempio essere bruciate per produrre CO_2 facendo passare il gas attraverso un tubo in quarzo riempito con CuO alla temperatura di 900 °C e catturando la CO_2 formata in un assorbitore contenente un alcale (17).

È necessaria una strumentazione da laboratorio per l'analisi chimica della sostanza di prova e dei prodotti di trasformazione [ad esempio cromatografia gas liquido (GLC), cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC), cromatografia su strato sottile (TLC), spettroscopia di massa (MS), gas cromatografia-spettroscopia di massa (GC-MS), cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS), risonanza magnetica nucleare (NMR), ecc.], ivi compresi i sistemi di rilevamento per le sostanze chimiche radiomarcate o non marcate, a seconda dei casi. Quando si usa materiale radiomarcato occorrono inoltre un contatore a scintillazione a liquido e un ossidatore a combustione (per la combustione dei campioni di sedimento prima dell'analisi della radioattività).

Servono inoltre altre normali attrezzature da laboratorio per misurazioni fisico-chimiche e biologiche (vedi la tabella 1, sezione 1.8.2.2), vetreria, sostanze chimiche e reagenti, secondo necessità.

([1]) Poiché queste soluzioni di assorbimento alcaline assorbono anche l'anidride carbonica proveniente dall'aria di ventilazione e quella prodotta per respirazione negli esperimenti aerobici, esse vanno cambiate ad intervalli regolari per evitarne la saturazione con conseguente perdita di capacità assorbente.

▼B

1.8.2 **Selezione e numero dei sedimenti acquatici**

I siti di campionamento vanno selezionati in funzione delle finalità del test in ogni situazione sperimentale. Ai fini della selezione dei siti di campionamento occorre prendere in considerazione tutti gli eventuali apporti agricoli, industriali e domestici verificatisi nella zona interessata e nelle acque a monte. Non vanno impiegati sedimenti che sono stati contaminati con la sostanza di prova o con i suoi analoghi strutturali nel corso dei precedenti 4 anni.

1.8.2.1 *Selezione del sedimento*

Per gli studi aerobici vengono normalmente usati due sedimenti (7). I due sedimenti selezionati dovrebbero essere diversi in quanto a contenuto di carbonio organico e tessitura. Uno dei sedimenti dovrebbe avere contenuto elevato di carbonio organico (2,5-7,5 %) e tessitura fine, mentre l'altro sedimento dovrebbe avere basso contenuto di carbonio organico (0,5-2,5 %) e tessitura grossa. La differenza tra i contenuti di carbonio organico deve essere normalmente pari almeno al 2 %. Per «tessitura fine» si intende un contenuto di [argilla + limo] ([1]) > 50 %, e per «tessitura grossa» un contenuto di [argilla + limo] < 50 %. Di norma la differenza di contenuto di [argilla + limo] dei due sedimenti deve essere almeno pari al 20 %. Nei casi in cui la sostanza chimica potrebbe anche raggiungere le acque marine è necessario che almeno uno dei sistemi acqua-sedimento abbia origine marina.

Per lo studio strettamente anaerobico vanno prelevati due campioni di sedimento (comprese le rispettive acque) da zone anaerobiche dei corpi d'acqua superficiali (7). Entrambe le fasi sedimentose e acquose vanno maneggiate e trasportate con cura in ambiente privo di ossigeno.

Potrebbero esserci altri fattori importanti nella scelta dei sedimenti, che vanno presi in considerazione caso per caso. L'intervallo di pH dei sedimenti, ad esempio, assumerebbe notevole importanza qualora la trasformazione e/o l'assorbimento della sostanza chimica oggetto della prova dipendessero dal pH. La dipendenza dal pH dell'assorbimento potrebbe riflettersi nel pK_a della sostanza di prova.

1.8.2.2 *Caratterizzazione dei campioni acqua-sedimento*

Nella tabella seguente sono riassunti i parametri principali da misurare e documentare (con riferimento al metodo utilizzato) sia per l'acqua, sia per il sedimento, con indicazione delle fasi del test in cui tali parametri vanno determinati. Per ulteriori informazioni sui metodi per la determinazione di questi parametri si rimanda ai riferimenti bibliografici (18)(19)(20)(21).

Potrebbe inoltre essere necessario misurare e documentare altri parametri, a seconda dei casi [ad esempio, per acqua dolce: particelle, alcalinità, durezza, conduttività, NO_3/PO_4 (rapporto e valori singoli); per i sedimenti: capacità di scambio cationico, capacità di trattenimento dell'acqua, carbonato, azoto e fosforo totali; per sistemi marini: salinità]. Per valutare le condizioni di ossido-riduzione potrebbe inoltre rivelarsi utile l'analisi di nitrato, solfato, ferro biodisponibile ed eventualmente altri accettori elettronici nell'acqua e nei sedimenti, soprattutto in relazione alla trasformazione anaerobica.

([1]) [Argilla + limo] è la frazione inorganica del sedimento con particelle di dimensione < 50 μm.

▼B

Rilevamento dei parametri per la caratterizzazione dei campioni acqua-sedimento (7)(22)(23)

Parametro	Fase del test					
	campionatura sul campo	post-manipolazione	inizio dell'acclimatazione	inizio della prova	durante la prova	termine della prova
Acqua						
Origine/fonte	x					
Temperatura	x					
pH	x		x	x	x	x
TOC			x	x		x
Concentrazione di O_2 (*)	x		x	x	x	x
Potenziale Redox (*)			x	x	x	x
Sedimento						
Origine/fonte	x					
Profondità dello strato	x					
pH		x	x	x	x	x
Distribuzione della dimensione delle particelle		x				
TOC		x	x	x		x
Biomassa microbica (**)		x		x		x
Potenziale Redox (*)	Osservazione (colore/odore)		x	x	x	x

(*) Studi recenti hanno mostrato che le misurazioni delle concentrazioni dell'ossigeno in acqua e dei potenziali redox non hanno valore meccanicistico né predittivo sulla crescita e lo sviluppo di popolazioni microbiche in acque superficiali (24)(25). La determinazione della domanda biochimica d'ossigeno (BOD, in corrispondenza della campionatura sul campo, dell'inizio e del termine della prova) e delle concentrazioni dei micro/macro nutrienti Ca, Mg e Mn (all'inizio e alla fine della prova) in acqua, nonché la misurazione dell'N totale e del P totale nei sedimenti (in corrispondenza della campionatura sul campo e al termine della prova) possono rivelarsi più adatte per l'interpretazione e la valutazione delle velocità e delle vie di biotrasformazione aerobica.

(**) Metodo della velocità di respirazione microbica (26), metodo di fumigazione (27) o conteggi in piastra (ad esempio batteri, attinomiceti, funghi e colonie totali) per gli studi aerobici; velocità di metanogenesi per gli studi anaerobici.

1.8.3 **Raccolta, manipolazione e conservazione**

1.8.3.1 *Raccolta*

Per la campionatura del sedimento va utilizzata la bozza di linea guida ISO sulla campionatura dei sedimenti depositati sul fondo (8). I campioni di sedimento vanno prelevati dall'intero strato superiore del sedimento, avente spessore di 5-10 cm. Le relative acque vanno raccolte nello stesso sito o ubicazione da cui viene prelevato il sedimento e nello stesso istante. Per gli studi anaerobici il prelievo e il trasporto del sedimento e dell'acqua relativa vanno effettuati in assenza di ossigeno (28) (vedi sezione 1.8.2.1). Alcuni dispositivi di campionatura sono descritti in bibliografia (8)(23).

▼B

1.8.3.2 *Manipolazione*

Il sedimento viene dapprima separato dall'acqua per filtrazione e poi setacciato a umido con un setaccio da 2 mm impiegando un eccesso di acqua locale, che viene poi gettata. Successivamente si mescolano quantità note di sedimenti e acqua nei rapporti desiderati (vedi sezione 1.9.1) utilizzando palloni di incubazione, le quali vengono poi preparate per il periodo di acclimatazione (vedi sezione 1.8.4). Per lo studio anaerobico tutte le operazioni di manipolazione vanno effettuate in assenza di ossigeno (29)(30)(31)(32)(33).

1.8.3.3 *Conservazione*

Si raccomanda vivamente di utilizzare sedimento e acqua campionati di fresco, ma se vi fossero necessità di conservazione occorre setacciare il sedimento e l'acqua come sopra descritto e conservarli insieme, coperti da uno strato d'acqua di 6-10 cm, al buio, a 4 ± 2 °C[4] per un massimo di 4 settimane (7)(8)(23). I campioni da utilizzare per gli studi aerobici vanno conservati all'aria (ad esempio in contenitori aperti), mentre per gli studi anaerobici occorre eliminare la presenza di ossigeno. I campioni non vanno congelati e il sedimento non va lasciato asciugare durante il trasporto e la conservazione.

1.8.4 **Preparazione dei campioni di sedimento/acqua per il test**

Prima dell'aggiunta della sostanza di prova occorre prevedere un periodo di acclimatazione, ponendo ciascun campione di sedimento/acqua nel recipiente di incubazione che verrà poi utilizzato per il test principale; l'acclimatazione va eseguita esattamente nelle stesse condizioni dell'incubazione di prova (vedi sezione 1.9.1). Il periodo di acclimatazione serve per raggiungere sufficiente stabilità nel sistema, valutata in base al pH, alla concentrazione di ossigeno nell'acqua, al potenziale redox di sedimento e acqua e alla separazione macroscopica delle fasi. Il periodo di acclimatazione è di norma compreso tra una e due settimane e comunque non supera le quattro settimane. I risultati delle determinazioni effettuate durante questo periodo vanno documentati.

1.9 ESECUZIONE DEL TEST

1.9.1 **Condizioni**

Il test va effettuato nell'attrezzatura di incubazione (vedi sezione 1.8.1) con rapporto volumetrico acqua/sedimento compreso tra 3:1 e 4:1 e strato del sedimento di 2,5 cm (± 0,5 cm) ([1]). Per ogni recipiente di incubazione si raccomanda una quantità minima di sedimento pari a 50 g (peso secco).

Il test va condotto al buio, a temperatura costante compresa tra 10 e 30 °C. La temperatura ideale è 20 ± 2 °C. In casi particolari può essere necessario eseguire un test anche a temperatura inferiore (ad esempio 10 °C), in funzione dei dati che si vogliono raccogliere. La temperatura d'incubazione va sottoposta a monitoraggio e documentata.

([1]) Alcuni studi recenti hanno dimostrato che la conservazione a 4 °C può comportare una diminuzione del contenuto in carbonio organico del sedimento, che potrebbe forse portare alla diminuzione dell'attività microbica (34).

▼B

1.9.2 **Trattamento e applicazione della sostanza di prova**

Viene utilizzata una sola concentrazione di prova della sostanza chimica ([1]). Per le sostanze fitosanitarie applicate direttamente ai corpi d'acqua, la dose massima riportata sull'etichetta rappresenta il tasso di applicazione massimo calcolato sulla base dell'area superficiale dell'acqua nel recipiente di prova. In tutti gli altri casi la concentrazione da utilizzare va basata su previsioni derivate dalle emissioni ambientali. La concentrazione delle sostanze di prova applicate va studiata con cura al fine di caratterizzare la via di trasformazione, nonché la formazione e la diminuzione dei prodotti di trasformazione. Può essere necessario applicare dosi più elevate (ad esempio 10 volte maggiori) in situazioni in cui le concentrazioni delle sostanze di prova sono vicine ai limiti di rilevamento all'inizio della prova, e/o nei casi in cui alcuni importanti prodotti di trasformazione non potrebbero venire facilmente determinati se presenti in quantità pari al 10 % del tasso di applicazione della sostanza di prova. Se però vengono impiegate concentrazioni di prova più elevate, queste non devono avere significativi effetti avversi sull'attività microbica del sistema acqua-sedimento. Al fine di ottenere una concentrazione costante della sostanza di prova in recipienti di dimensione diversa, va presa in considerazione l'opportunità di modificare la quantità del materiale applicato sulla base della profondità della colonna d'acqua nel recipiente rispetto alla profondità dell'acqua sul campo (presunta pari a 100 cm, ma possono essere usate altre profondità). Un esempio di calcolo è riportato nell'allegato 4.

Nel caso ideale la sostanza di prova va applicata alla fase acquosa del sistema di prova sotto forma di soluzione acquosa. È ammesso, nei casi in cui ciò sia inevitabile, l'uso di piccole quantità di solventi miscibili in acqua (ad es. acetone, etanolo) per l'applicazione e la distribuzione della sostanza di prova, senza tuttavia superare l'1 % v/v ed evitando in ogni caso il rischio di produrre effetti avversi sull'attività microbica del sistema di prova. La soluzione acquosa della sostanza di prova va preparata con cautela; per garantire un'omogeneità completa può rivelarsi utile l'impiego di colonne di generazione e di premiscelazione. Dopo l'aggiunta della soluzione acquosa al sistema di prova si raccomanda di miscelare leggermente la fase acquosa, disturbando il meno possibile il sedimento.

L'uso di prodotti formulati non è consigliato in condizioni normali, perché gli ingredienti della formulazione possono influire sulla distribuzione della sostanza di prova e/o dei prodotti di trasformazione tra le fasi acquosa e sedimentosa. Nel caso di sostanze di prova scarsamente idrosolubili l'impiego di materiale formulato può rappresentare però un'alternativa appropriata.

Il numero di recipienti di incubazione dipende dal numero dei tempi di campionatura (vedi sezione 1.9.3). Il numero dei sistemi di prova deve essere sufficiente a consentire il sacrificio di due sistemi per ciascun tempo di campionatura. Se si impiegano unità di controllo per ciascun sistema sedimentoso acquatico, esse non vanno trattate con la sostanza di prova. Le unità di controllo possono essere usate per determinare la biomassa microbica del sedimento e il carbonio organico totale di acqua e sedimento al termine dello studio. Due unità di controllo (cioè un'unità di controllo per ciascun sedimento acquatico) possono essere utilizzate per monitorare i parametri richiesti nel sedimento e nell'acqua durante il periodo di acclimatazione (vedi tabella in sezione 1.8.2.2). Vanno incluse due unità di controllo aggiuntive nel caso in cui la sostanza di prova venga applicata mediante un solvente in modo da poter misurare gli effetti avversi sull'attività microbica del sistema di prova.

([1]) Per sostanze chimiche che raggiungono le acque superficiali per vie d'ingresso diverse, comportanti concentrazioni significativamente diverse, potrebbero rivelarsi utili prove con una seconda concentrazione, a condizione che la concentrazione inferiore possa essere analizzata con accuratezza sufficiente.

▼B

1.9.3 **Durata del test e campionatura**

La durata dell'esperimento non deve normalmente eccedere 100 giorni (6) e dovrebbe continuare fino alla determinazione delle vie di degradazione e delle caratteristiche di distribuzione acqua/sedimento, oppure fino alla dissipazione del 90 % della sostanza di prova a seguito di trasformazione e/o volatilizzazione. I tempi di campionatura devono essere almeno sei (tempo zero compreso), ricorrendo opzionalmente ad uno studio preliminare (vedi sezione 1.9.4) per determinare un regime di campionatura appropriato e la durata del test, salvo quando esistano dati sufficienti sulla sostanza di prova ottenuti da studi precedenti. Per sostanze di prova idrofobiche potrebbero rivelarsi necessari punti di campionatura aggiuntivi durante il periodo iniziale dello studio, allo scopo di determinare la velocità di distribuzione tra le fasi acquosa e sedimentosa.

In corrispondenza dei tempi di campionatura accuratamente selezionati si rimuovono i recipienti di incubazione interi (in duplicato) da sottoporre all'analisi. Il sedimento e l'acqua soprastante vengono analizzati separatamente ([1]). L'acqua superficiale va rimossa con attenzione, disturbando il meno possibile il sedimento. L'estrazione e la caratterizzazione della sostanza di prova e dei prodotti di trasformazione devono rispettare le procedure analitiche del caso. Va rimosso con attenzione l'eventuale materiale adsorbito nei recipienti di incubazione o nei tubi di interconnessione utilizzati per catturare le sostanze volatili.

1.9.4 **Prova preliminare opzionale**

Se la durata e il regime di campionatura non possono essere stimati sulla base di altri studi effettuati sulla sostanza di prova, può essere utile svolgere una prova preliminare opzionale, che va in tal caso effettuata alle stesse condizioni di prova proposte per lo studio definitivo. Le condizioni sperimentali e i risultati dell'eventuale prova preliminare vanno documentati brevemente.

1.9.5 **Misurazioni e analisi**

È necessario misurare e riportare la concentrazione della sostanza di prova e dei prodotti di trasformazione nell'acqua e nel sedimento in corrispondenza di ciascun tempo di campionatura (espressa come concentrazione e come percentuale della sostanza applicata). In via generale, per ciascun tempo di campionatura vanno identificati i prodotti di trasformazione rilevati a $\geq$ 10 % della radioattività applicata al sistema totale acqua-sedimento, a meno che vi siano motivi ragionevoli che consiglino altrimenti. Va inoltre presa in considerazione l'opportunità di identificare i prodotti di trasformazione le cui concentrazioni aumentano in modo continuativo durante lo studio, pur non eccedendo i limiti sopra riportati, poiché tale aumento può essere indicativo di persistenza. Questi aspetti vanno affrontati caso per caso, motivando nella relazione le soluzioni adottate.

I risultati ottenuti dai sistemi per la cattura di gas e sostanze volatili (CO_2 e altri, cioè sostanze organiche volatili) vanno riportati per ciascun tempo di campionatura. Le velocità di mineralizzazione vanno anch'esse riportate. I residui non estraibili (legati) nel sedimento vanno riportati per ciascun punto di campionatura.

([1]) In casi in cui può verificarsi facilmente una rapida riossidazione dei prodotti di trasformazione anaerobici occorre mantenere le condizioni anaerobiche durante tutta la campionatura e l'analisi.

▼B

2. **DATI**

2.1 TRATTAMENTO DEI RISULTATI

Per ciascun tempo di campionatura si calcolano il bilancio di massa totale o il recupero (vedi sezione 1.7.1) della radioattività aggiunta. I risultati vanno espressi come percentuale della radioattività aggiunta. La distribuzione della radioattività tra acqua e sedimento va espressa come concentrazione e in percentuale, per ciascun tempo di campionatura.

Il tempo di dimezzamento, il DT_{50} ed eventualmente il DT_{75} e il DT_{90} della sostanza di prova vanno calcolati con i rispettivi intervalli di confidenza (vedi sezione 1.7.3). I dati sulla velocità di dissipazione della sostanza di prova nell'acqua e nel sedimento possono essere ricavati mediante opportuni strumenti di valutazione. Essi possono comprendere l'applicazione di cinetiche dello pseudo primo ordine, tecniche empiriche di interpolazione con curve che applicano soluzioni grafiche o numeriche, e valutazioni più complesse, tra cui modelli a compartimento singolo o multiplo. Per maggiori dettagli si rimanda alle rispettive pubblicazioni (35)(36)(37).

Tutte le tecniche hanno punti forti e punti deboli e possono variare notevolmente in quanto a complessità. L'ipotesi di una cinetica del primo ordine può semplificare eccessivamente i processi di degradazione e distribuzione, ma in determinati casi essa consente di disporre di un valore (la costante di velocità o il tempo di dimezzamento) che può essere compreso facilmente ed è utile nei modelli di simulazione e nei calcoli di previsione delle concentrazioni ambientali. Le soluzioni empiriche o le trasformazioni lineari possono fornire interpolazioni più aderenti e consentire pertanto una stima migliore dei tempi di dimezzamento, del DT_{50} ed eventualmente dei DT_{75} e DT_{90}. L'uso delle costanti così derivate è però limitato. I modelli a compartimento possono dare luogo a diverse costanti utili ai fini della valutazione dei rischi, per descrivere la velocità di degradazione in compartimenti diversi e la distribuzione delle sostanze chimiche. Essi vanno inoltre utilizzati per stimare le costanti di velocità per la formazione e la degradazione dei prodotti di trasformazione principali. In tutti i casi il metodo prescelto va motivato e lo sperimentatore deve dimostrare graficamente e/o statisticamente la bontà dell'interpolazione.

3. **RELAZIONE**

3.1 RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL TEST

La relazione deve comprendere le seguenti informazioni:

Sostanza di prova:

— denominazione comune, nome chimico, numero CAS, formula di struttura (indicante la posizione della marcatura o delle marcature quando si utilizzano materiali radiomarcati) e proprietà fisicochimiche rilevanti;

— purezza (impurità) della sostanza di prova;

— purezza radiochimica della sostanza chimica marcata e attività molare (nei casi opportuni).

▼B

Sostanze di riferimento:

— nome chimico e struttura delle sostanze di riferimento utilizzate per la caratterizzazione e/o l'identificazione dei prodotti di trasformazione.

Sedimenti e acque di prova:

— ubicazione e descrizione dei siti di campionatura dei sedimenti acquatici, precisando se possibile i casi di contaminazione che si sono verificati;

— tutte le informazioni riguardanti il prelievo, l'eventuale conservazione e l'acclimatazione dei sistemi acqua-sedimento;

— caratteristiche dei campioni acqua-sedimento come riportato nella tabella in sezione 1.8.2.2.

Condizioni del test:

— sistema di prova utilizzato (ad esempio flusso, biometro, modalità di ventilazione, metodo di agitazione, volume d'acqua, massa del sedimento, spessore degli strati acquoso e sedimentoso, dimensione dei recipienti di prova, ecc.);

— applicazione della sostanza di prova al sistema di prova: concentrazione di prova utilizzata, numero dei replicati e dei controlli, modalità di applicazione della sostanza di prova (ad esempio eventuale uso di solvente), ecc.;

— temperatura di incubazione;

— tempi di campionatura;

— metodi di estrazione e relative efficienze, oltre ai metodi analitici e ai limiti di rivelabilità;

— metodi di caratterizzazione/identificazione dei prodotti di trasformazione;

— deviazioni dai protocolli di prova o dalle condizioni di prova durante lo studio.

Risultati:

— dati grezzi delle analisi rappresentative (tutti i dati grezzi vanno conservati nell'archivio GLP);

— ripetibilità e sensibilità dei metodi analitici utilizzati;

— tassi di recupero (i valori percentuali per la validità dello studio sono riportati nella sezione 1.7.1);

— tabelle dei risultati, espressi come percentuale della dose applicata e in $mg \cdot kg^{-1}$ in acqua, sedimento e sistema totale (percentuale soltanto) per la sostanza di prova e, se appropriato, per i prodotti di trasformazione e la radioattività non estraibile;

— bilancio di massa durante gli studi e al termine degli studi;

— rappresentazione grafica della trasformazione nelle frazioni acquosa e sedimentosa e nel sistema totale (mineralizzazione compresa);

— velocità di mineralizzazione;

▼B

— tempo di dimezzamento, DT_{50} ed eventualmente DT_{75} e DT_{90} della sostanza di prova e, se del caso, per i principali prodotti di trasformazione, compresi gli intervalli di confidenza in acqua, nel sedimento e nel sistema totale;

— valutazione delle cinetiche di trasformazione della sostanza di prova e, se del caso, dei principali prodotti di trasformazione;

— via di trasformazione proposta, se del caso;

— discussione dei risultati.

4. **BIBLIOGRAFIA**

(1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

(2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

(3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.

(4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) — Anaerobic and aerobic. Canada. pp 35-37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality — Sampling — Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

(9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

(10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

(13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC — Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.

▼B

(15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631-637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661-667.

(18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

(21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038-1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop «A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests», 3-4 July 1991.

(23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858-2868.

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, 329-338.

(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197-203.

(27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13-21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850-857.

(30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499-1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597-3603.

(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

(34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, 961-968.

(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 39, 187-203.

(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 33, 47-60.

(37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference — Pest and Diseases, pp 1349-1354.

▼B

ALLEGATO 1

LINEE GUIDA SUI SISTEMI DI PROVA AEROBICI E ANAEROBICI

Sistema di prova aerobico

Il sistema di prova aerobico descritto in questo metodo di prova consiste di uno strato di acqua aerobico (concentrazioni di ossigeno tipiche comprese tra 7 e 10 $mg \cdot l^{-1}$) e uno strato sedimentoso aerobico in superficie e anaerobico sotto la superficie [potenziali redox (E_h) medi tipici nella zona anaerobica del sedimento compresi tra - 80 e - 190 mV]. Dell'aria inumidita viene fatta passare sopra la superficie dell'acqua in ciascuna unità di incubazione per mantenere una quantità sufficiente di ossigeno nello spazio di testa.

Sistema di prova anaerobico

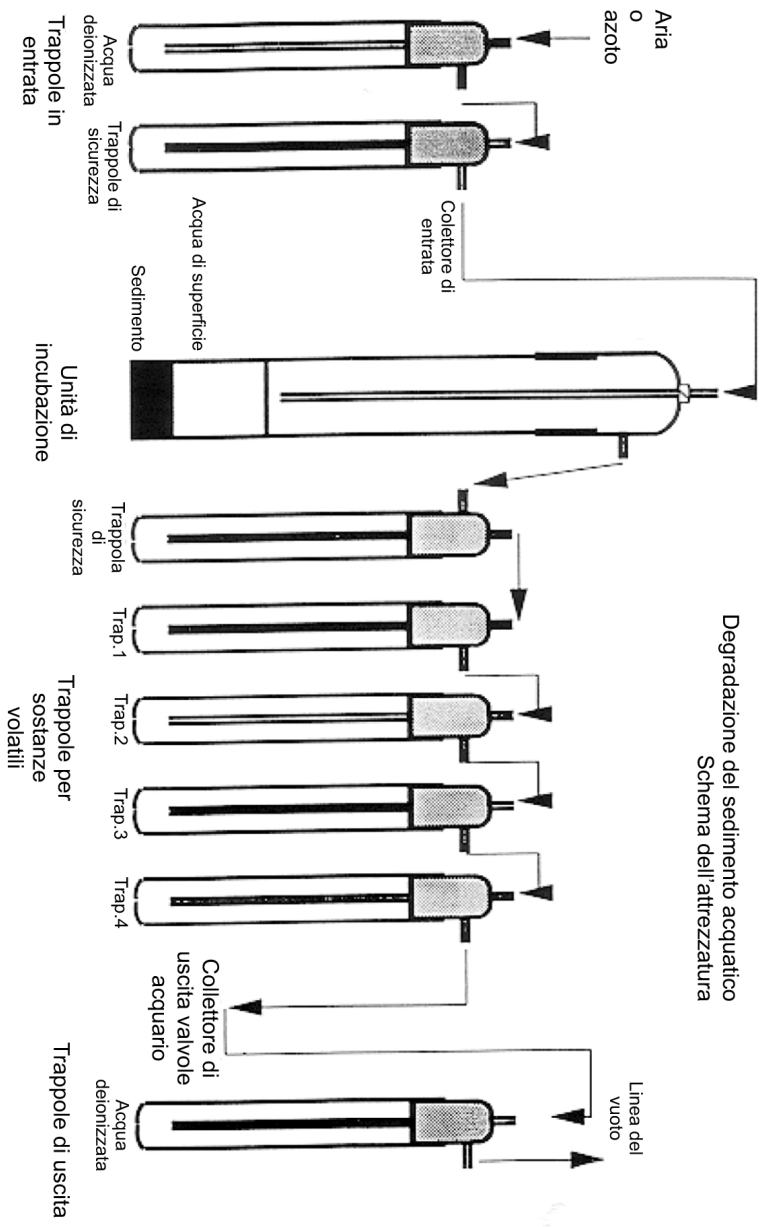
Per il sistema di prova anaerobico la procedura di prova è sostanzialmente uguale a quella delineata per il sistema aerobico, con la differenza che viene fatto passare dell'azoto inumidito sopra la superficie dell'acqua in ciascuna unità di incubazione per mantenere uno spazio di testa di azoto. Il sedimento e l'acqua vengono considerati anaerobici se il potenziale redox (E_h) è minore di - 100 mV.

Nella prova anaerobica la valutazione della mineralizzazione comprende la misurazione dell'anidride carbonica e del metano prodotti.

▼B

ALLEGATO 2

ESEMPIO DI UN ATTREZZATURA A FLUSSO CONTINUO

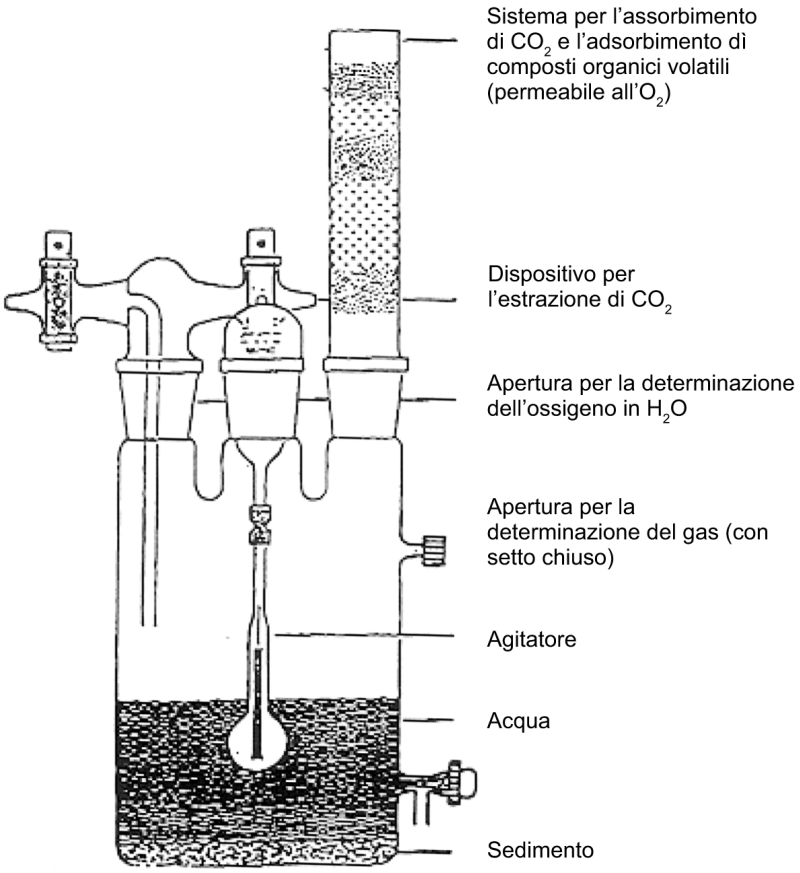


Trappola di sicurezza vuota
Trappola 1:
Etilenglicole per catturare sostanze organiche volatili
Trappola 2:
Acido solforico 0,1 M per catturare sostanze volatili alcaline
Trappole 3 e 4:
Sodio idrossido 2M per catturare CO_2 e altre sostanze volatili acide

▼B

ALLEGATO 3

ESEMPIO DI UN'ATTREZZATURA A BIOMETRO



▼B

ALLEGATO 4

ESEMPIO DI CALCOLO PER LA DOSE DI APPLICAZIONE NEI RECIPIENTI DI PROVA

Diametro interno del cilindro:	= 8 cm
Profondità della colonna d'acqua, sedimento escluso:	= 12 cm
Area di superficie: $3{,}142 \times 4^2$	= 50,3 cm^2
Tasso di applicazione: 500 g di sostanza di prova/ha corrispondente a 5 $\mu g/cm^2$	
Totale µg: $5 \times 50{,}3$	= 251,5 µg
Regolazione della quantità in relazione ad una profondità di 100 cm: $12 \times 251{,}5 \div 100$	= 30,18 µg
Volume della colonna d'acqua: $50{,}3 \times 12$	= 603 ml
Concentrazione in acqua: $30{,}18 \div 603$	= 0,050 µg/ml oppure 50 µg/l

▼M1

C.25. MINERALIZZAZIONE AEROBICA DELLE ACQUE DI SUPERFICIE — SAGGIO DI SIMULAZIONE DELLA BIODEGRADAZIONE

1. METODO

Questo metodo è equivalente al metodo dell'OCSE TG 309 (2004) (1).

1.1. INTRODUZIONE

Questo saggio serve a misurare i tempi di biodegradazione di una sostanza di prova a bassa concentrazione in acque naturali aerobiche e a quantificare i risultati sotto forma di espressioni delle velocità cinetiche. Questo saggio di simulazione è realizzato in discontinuo (batch) in flaconi collocati in un agitatore per determinare la biodegradazione aerobica di sostanze organiche in campioni di acque di superficie naturali (dolci, salmastre o marine). È basato sulla norma ISO/DIS 14592-1 (2) e comprende anche elementi dei metodi di prova C.23 e C.24 (3)(4). In via facoltativa, con tempi di prova prolungati, un procedimento semi-continuo può sostituire il procedimento in discontinuo per evitare di deteriorare il microcosmo di prova. L'obiettivo principale del saggio di simulazione è la possibilità di determinare la mineralizzazione della sostanza di prova nelle acque di superficie, che rappresenta la base per esprimere la cinetica della degradazione. Un obiettivo secondario e facoltativo del saggio è quello di ottenere informazioni sulla degradazione primaria e sulla formazione dei principali prodotti di trasformazione (metaboliti). L'identificazione dei prodotti di trasformazione e l'eventuale quantificazione delle rispettive concentrazioni sono dati particolarmente importanti per le sostanze che vengono mineralizzate molto lentamente (per esempio che presentano tempi di dimezzamento per il ^{14}C totale residuo superiori a 60 giorni). Per l'individuazione e la quantificazione dei principali metaboliti in genere si dovrebbero utilizzare concentrazioni più elevate della sostanza di prova (per esempio, > 100 μg/l) a causa dei limiti analitici.

Nell'ambito di questo saggio per «bassa concentrazione» s'intende una concentrazione abbastanza bassa (per esempio inferiore a 1 μg/l e fino a 100 μg/l) da garantire che la cinetica di biodegradazione ottenuta durante il saggio rispecchi quelle che si possono attendere nell'ambiente naturale. Rispetto alla massa totale dei substrati di carbonio biodegradabili presenti nelle acque naturali utilizzate per il saggio, la sostanza di prova a bassa concentrazione fungerà da substrato secondario. Ciò implica che la cinetica di biodegradazione prevista è del 1° ordine (cinetica di «non crescita») e che la sostanza di prova può essere degradata per «co-metabolismo». Nella cinetica del 1° ordine la velocità di degradazione (mg/L/giorno) è proporzionale alla concentrazione di substrato che diminuisce nel tempo. Nel caso di una vera cinetica del 1° ordine la costante di velocità di degradazione specifica, k, è indipendente dal tempo e dalla concentrazione. In altri termini, la costante k non varia molto nel corso di un esperimento e non varia con le concentrazioni aggiunte tra un esperimento e l'altro. Per definizione la costante di velocità di degradazione specifica è uguale al cambiamento relativo di concentrazione per il tempo: $k = (1/C) \bullet (dC/dt)$. Anche se in genere, nelle condizioni descritte, è verosimile attendersi una cinetica del 1° ordine, in alcuni casi altre cinetiche possono rivelarsi più adatte. Deviazioni rispetto alla cinetica del 1° ordine possono, per esempio, essere osservate se fenomeni di trasferimento di massa come la velocità di diffusione piuttosto che la velocità di reazione biologica sono un fattore limitante della velocità di biotrasformazione. Tuttavia, è quasi sempre possibile descrivere i dati con una cinetica di psuedo-1° ordine, accettando una costante di velocità dipendente dalla concentrazione.

▼M1

Le informazioni sulla biodegradabilità della sostanza di prova a concentrazioni più elevate (desunte, per esempio, da saggi di screening standard) e le informazioni sulla degradabilità abiotica, sui metaboliti e sulle rispettive proprietà fisico-chimiche devono essere disponibili prima dell'inizio del saggio per poterlo pianificare e interpretarne i risultati. L'uso di sostanze di prova marcate con ^{14}C e la determinazione della distribuzione di fase del ^{14}C al termine del saggio permettono di determinare la biodegradabilità completa. Se si utilizzano sostanze non marcate, la biodegradazione completa si può stimare solo se il saggio è eseguito a concentrazione più elevata e se sono noti tutti i principali metaboliti.

1.2. DEFINIZIONI

Biodegradazione primaria: modifica strutturale (trasformazione) di una sostanza chimica da parte di microrganismi risultante nella perdita dell'identità chimica.

Biodegradazione funzionale: modifica strutturale (trasformazione) di una sostanza chimica da parte di microrganismi risultante nella perdita di una proprietà specifica.

Biodegradazione aerobica completa: scomposizione di una sostanza chimica da parte di microrganismi in presenza di ossigeno e formazione di biossido di carbonio, acqua e sali minerali di qualsiasi altro elemento presente (mineralizzazione) e produzione di nuova biomassa e prodotti organici per biosintesi microbica.

Mineralizzazione: scomposizione di una sostanza chimica o di materia organica da parte di microrganismi in presenza di ossigeno e formazione di biossido di carbonio, acqua e sali minerali di qualsiasi altro elemento presente.

Fase di latenza: tempo intercorso dall'inizio del saggio fino all'adattamento dei microrganismi di degradazione e all'aumento del livello di degradazione di una sostanza chimica o materia organica fino al limite rilevabile (per esempio 10 % o meno della biodegradazione teorica massima, in funzione dell'accuratezza della tecnica di misura).

Livello massimo di biodegradazione: livello di biodegradazione di una sostanza chimica o di materia organica nel corso del saggio, espresso in percentuale, al di sopra del quale non c'è ulteriore biodegradazione durante il saggio.

Substrato primario: collezione di fonti naturali di carbonio e di energia che garantiscono la crescita e il mantenimento della biomassa microbica.

Substrato secondario: componente del substrato presente in una concentrazione talmente bassa che, con la biodegradazione, fornisce solo quantitativi insignificanti di carbonio ed energia ai microrganismi competenti, rispetto al carbonio e all'energia forniti dalla degradazione dei componenti del substrato principale (substrati primari).

Costante di velocità di degradazione: costante di velocità cinetica del 1° ordine o pseudo-1° ordine, k (giorni^{-1}), che indica la velocità dei processi di degradazione. Per un esperimento in discontinuo la costante k è stimata a partire dalla parte iniziale della curva di degradazione ottenuta dopo la fase di latenza.

▼M1

Tempo di emivita, $t_{1/2}$ (giorni): termine usato per indicare la velocità di una reazione di 1° ordine. Corrisponde all'intervallo di tempo necessario perché la concentrazione diminuisca del 50 %. La relazione tra il tempo di emivita e la costante di velocità di degradazione è rappresentata dalla seguente equazione $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Tempo di dimezzamento di degradazione, DT_{50} (giorni): espressione utilizzata per quantificare l'esito dei saggi di biodegradazione. Corrisponde all'intervallo di tempo, compresa la fase di latenza, necessario per raggiungere il 50 % della biodegradazione.

Limite di rilevabilità (LOD) e limite di quantificazione (LOQ): il limite di rilevabilità (LOD) è la concentrazione di una sostanza al di sotto della quale non è possibile distinguerla dagli artefatti della tecnica di analisi utilizzata. Il limite di quantificazione (LOQ) è la concentrazione di una sostanza al di sotto della quale non è possibile determinare la concentrazione con un'accuratezza accettabile.

Carbonio organico disciolto (DOC): frazione del carbonio organico contenuto in un campione d'acqua che non può essere eliminato con una separazione di fase, per esempio per centrifugazione a 40 000 ms^{-2} per 15 minuti o con membrana filtrante con pori di 0,2 μm-0,45 μm di diametro.

Attività totale del ^{14}C organico (TOA): l'attività complessiva del ^{14}C associata al carbonio organico.

Attività del ^{14}C organico disciolto (DOA): l'attività complessiva del ^{14}C associata al carbonio organico disciolto.

Attività del ^{14}C organico particellato (POA): l'attività complessiva del ^{14}C associata al carbonio organico particellato.

1.3. APPLICABILITÀ DEL SAGGIO

Il saggio di simulazione è applicabile a sostanze organiche non volatili o leggermente volatili testate a basse concentrazioni. Se si utilizzano flaconi non ermetici (per esempio chiusi con tappi in cotone idrofilo), le sostanze che presentano costanti di Henry inferiori a circa 1 $Pa•m^3/mol$ (circa 10^{-5} $atm•m^3/mol$) nella pratica possono essere considerate non volatili. Se si utilizzano flaconi chiusi con uno spazio libero nella parte superiore, è possibile sottoporre al saggio sostanze leggermente volatili (con costanti di Henry < 100 $Pa•m^3/mol$ o < 10^{-3} $atm•m^3/mol$) senza perdite dal sistema di saggio. Vi può essere perdita di sostanze marcate con ^{14}C in assenza di precauzioni adeguate, quando avviene lo strippaggio del CO_2. In tal caso può essere necessario intrappolare il CO_2 in un assorbente alcalino interno oppure utilizzare un sistema esterno di assorbimento del CO_2 (per la determinazione diretta del $^{14}CO_2$ cfr. appendice 3). Per determinare la cinetica di biodegradazione, le concentrazioni della sostanza di prova devono essere inferiori alla solubilità della sostanza in acqua. Occorre tuttavia rilevare che i valori della solubilità in acqua indicati in letteratura possono essere molto più elevati della solubilità della sostanza di prova nelle acque naturali. In via facoltativa, è possibile stabilire la solubilità di sostanze di prova scarsamente solubili in acqua utilizzando le acque naturali oggetto del saggio.

Questo metodo può essere utilizzato per simulare la biodegradazione in acque di superficie che non presentano grosse particelle (saggio pelagico) oppure in acque di superficie torbide che si possono, per esempio, trovare nei pressi di un'interfaccia acque/sedimenti (saggio con sedimento in sospensione).

▼M1

1.4. PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio viene eseguito in discontinuo (batch) incubando la sostanza di prova unicamente con acqua superficiale (saggio pelagico) oppure con acqua superficiale addizionata con solidi/sedimento in sospensione di peso a secco compreso tra 0,01 e 1 g/l (saggio con sedimento in sospensione) per simulare un corpo idrico con solidi in sospensione o sedimenti in risospensione. In genere, nella maggior parte delle acque superficiali la concentrazione dei solidi/sedimenti sospesi si colloca nella fascia bassa di questo intervallo. I flaconi utilizzati per il saggio sono incubati al buio a temperatura ambiente in condizioni aerobiche e agitati. Per determinare la cinetica di degradazione è necessario utilizzare almeno due concentrazioni diverse della sostanza di prova. Le concentrazioni devono differenziarsi tra loro di un fattore compreso tra 5 e 10 e devono rappresentare l'intervallo di concentrazioni che si possono attendere nell'ambiente naturale. La concentrazione massima della sostanza di prova non deve superare 100 µg/l, ma è preferibile utilizzare concentrazioni massime inferiori a 10 µg/l per garantire che la biodegradazione presenti una cinetica del 1° ordine. La concentrazione più bassa non deve superare 10 µg/l, ma è preferibile utilizzare concentrazioni pari a 1-2 µg/l o inferiori a 1 µg/l. In genere è possibile procedere ad un'analisi adeguata di tali basse concentrazioni con l'utilizzo della sostanze marcate con ^{14}C reperibili in commercio. A causa dei limiti analitici, spesso risulta impossibile misurare la concentrazione della sostanza di prova con la dovuta accuratezza se la sostanza presenta una concentrazione ≤ 100 µg/l (cfr. punto 1.7.2, secondo paragrafo). È possibile utilizzare concentrazioni più elevate della sostanza di prova (> 100 µg/l e a volte > 1 mg/l) per identificare e quantificare i principali metaboliti o se non è disponibile un metodo di analisi specifico con un limite di rilevabilità basso. Se vengono testate concentrazioni elevate della sostanza, può non essere possibile utilizzare i risultati per stimare la costante di degradazione del 1° ordine e l'emivita, perché è probabile che la degradazione non segua una cinetica del 1° ordine.

Il processo di degradazione deve essere verificato a intervalli di tempo adeguati, misurando il ^{14}C residuo o la concentrazione residua della sostanza di prova se si utilizza un'analisi chimica specifica. La marcatura della parte più stabile della molecola con ^{14}C consente di determinare la mineralizzazione totale, mentre la marcatura con ^{14}C della parte meno stabile della molecola e l'impiego di analisi specifiche permettono di valutare solo la biodegradazione primaria. La parte più stabile non include, però, necessariamente la frazione rilevante sotto il profilo funzionale della molecola (che può essere correlata ad una proprietà specifica come la tossicità, il bioaccumulo ecc.). In tal caso può essere opportuno utilizzare una sostanza di prova, marcata con ^{14}C, nella parte funzionale per verificare l'eliminazione della proprietà specifica.

1.5. INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA DI PROVA

Per questo saggio è possibile utilizzare sostanze radiomarcate e non. La tecnica di marcatura che utilizza il ^{14}C è quella raccomandata e in genere la marcatura deve avvenire nella o nelle parti più stabili della molecola (cfr. anche il punto 1.4). Per le sostanze che contengono più di un anello aromatico, è preferibile marcare con il ^{14}C uno o più atomi di carbonio in ciascun anello. È inoltre preferibile marcare con ^{14}C uno o più atomi di carbonio situati su entrambi i lati dei legami facilmente degradabili. La sostanza deve presentare una purezza chimica e/o radiochimica > 95 %. Per le sostanze radiomarcate è preferibile un'attività specifica di circa 50 µCi/mg (1,85 MBq) o superiore per facilitare la misurazione del ^{14}C durante i saggi effettuati a basse concentrazioni iniziali. È necessario disporre delle seguenti informazioni sulla sostanza di prova:

▼M1

— solubilità in acqua (Metodo A.6),

— solubilità in solventi organici (sostanze applicate con solvente o a bassa solubilità in acqua),

— costante di dissociazione (pKa) se la sostanza è soggetta a protonazione o deprotonazione (OCSE TG 112) (5),

— pressione di vapore (Metodo A.4) e costante di Henry,

— stabilità chimica nell'acqua e al buio (idrolisi) (Metodo C.7).

Quando sostanze scarsamente solubili in acqua vengono testate in acqua di mare, può essere utile conoscere la costante di Setschenow (o «costante di salting-out») K^s, definita dalla seguente espressione: $\log (S/S') = K^s C_m$, dove S e S' sono la solubilità della sostanza in acque dolci e in acque marine, rispettivamente, e C_m è la concentrazione molare di sale.

Se viene eseguito il «saggio con sedimento in sospensione» è necessario disporre anche dei seguenti dati:

— coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua (Metodo A.8),

— coefficiente di adsorbimento (Metodo C.18).

Altri dati utili possibili:

— concentrazione ambientale (conosciuta o stimata),

— tossicità della sostanza di prova per i microrganismi (Metodo C.11),

— biodegradabilità pronta e/o intrinseca [Metodi C.4 A-F, C.12, C.9, OCSE TG 302 (5)],

— biodegradabilità aerobica o anaerobica negli studi di trasformazione nel suolo e in sedimenti/acqua (Metodi C.23, C.24).

1.6. SOSTANZA DI RIFERIMENTO

Come sostanza di riferimento deve essere utilizzata una sostanza che in genere si degrada facilmente in condizioni aerobiche (per esempio l'anilina o il benzoato di sodio). L'intervallo di tempo atteso per la degradazione dell'anilina e del benzoato di sodio è in genere inferiore a due settimane. Le sostanze di riferimento servono a garantire che l'attività microbica delle acque di prova rientri entro determinati limiti (cioè che l'acqua contenga una popolazione microbica attiva).

▼M1

1.7. CRITERI DI QUALITÀ

1.7.1. **Recupero**

Subito dopo aver aggiunto la sostanza di prova è necessario verificare ogni concentrazione iniziale di prova misurando l'attività del ^{14}C, oppure procedendo ad analisi chimiche se non vengono utilizzate sostanze marcate, almeno su due campioni uguali. In questo modo si ottengono informazioni sull'applicabilità e sulla ripetibilità del metodo di analisi e sull'omogeneità della distribuzione della sostanza di prova. In genere nelle analisi successive dei dati si utilizza l'attività iniziale del ^{14}C misurata o la concentrazione della sostanza di prova piuttosto che la concentrazione nominale perché in questo modo vengono compensati le perdite dovute all'assorbimento-adsorbimento e gli errori di dosaggio. Per una sostanza di prova marcata con ^{14}C, il livello di recupero al termine dell'esperimento è dato dal bilancio di massa (cfr. ultimo paragrafo del punto 1.8.9.4). Idealmente il bilancio di massa di una sostanza radiomarcata dovrebbe oscillare tra il 90 % e il 110 %, mentre l'accuratezza dell'analisi dovrebbe dare un recupero iniziale compreso tra il 70 % e il 110 % per le sostanze di prova non marcate. Questi intervalli devono intendersi come obiettivi e non devono essere utilizzati come criteri di accettazione del saggio. In via facoltativa, l'accuratezza dell'analisi può essere determinata per una sostanza di prova a una concentrazione più bassa rispetto alla concentrazione iniziale e per i principali metaboliti.

1.7.2. **Ripetibilità e sensibilità del metodo analitico**

La ripetibilità del metodo analitico (compresa l'efficienza dell'estrazione iniziale) per quantificare la sostanza di prova ed eventualmente i metaboliti deve essere verificata con cinque analisi replicate dei singoli estratti delle acque superficiali.

Il limite di rilevabilità (LOD) del metodo analitico per la sostanza di prova e i metaboliti deve essere, se possibile, pari ad almeno l'1 % del quantitativo iniziale applicato al sistema di saggio. Il limite di quantificazione (LOQ) deve essere uguale o inferiore al 10 % della concentrazione applicata. Le analisi chimiche di molte sostanze organiche e dei loro metaboliti spesso impongono che la sostanza di prova sia applicata ad una concentrazione relativamente elevata, cioè > 100 µg/l.

1.8. DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

1.8.1. **Apparecchiature**

Il saggio può essere eseguito in flaconi conici o cilindrici di capacità adeguata (per esempio 0,5 o 1 litro) chiusi con tappi di silicone o di gomma, oppure in flaconi di siero con coperchi ermetici al CO_2 (per esempio dotati di tappi in gomma di butile). In alternativa è possibile eseguire il saggio utilizzando flaconi multipli e prelevare flaconi interi (almeno due), per ogni intervallo di campionamento (cfr. ultimo paragrafo del punto 1.8.9.1). Per le sostanze di prova non volatili che non sono state radiomarcate, non sono necessari coperchi o tappi ermetici; bastano invece tappi in cotone che impediscano la contaminazione con aria (cfr. punto 1.8.9.1, secondo paragrafo). Le sostanze leggermente volatili devono essere testate in un sistema tipo biometro con leggera agitazione dell'acqua superficiale. Per evitare qualsiasi tipo di contaminazione batterica, prima dell'uso è possibile sterilizzare i recipienti riscaldandoli o in autoclave. Vengono inoltre impiegate le seguenti apparecchiature di laboratorio standard:

— tavola vibrante o agitatori magnetici per l'agitazione continua dei flaconi di prova,

▼M1

— centrifuga,

— misuratore di pH,

— turbidimetro per misure nefelometriche della torbidità,

— forno o forno a microonde per determinare il peso a secco,

— apparecchio di filtrazione a membrana,

— autoclave o forno per sterilizzare i recipienti in vetro,

— strutture per la manipolazione delle sostanze marcate con ^{14}C,

— apparecchiature per quantificare l'attività del ^{14}C in campioni ricavati da soluzioni che intrappolano il CO_2 e, se necessario, da campioni di sedimento,

— apparecchiatura di analisi per determinare la sostanza di prova (e di riferimento) se viene utilizzata un'analisi chimica specifica (come il gascromatografo o il cromatografo liquido ad alta pressione).

1.8.2. **Soluzioni madre della sostanza di prova**

Per preparare le soluzioni madre delle sostanze di prova e di riferimento si utilizza acqua deionizzata (cfr. punto 1.8.7, primo paragrafo). Nell'acqua deionizzata non devono essere presenti sostanze che possono risultare tossiche per i microrganismi; il carbonio organico disciolto (DOC) non deve essere superiore a 1 mg/l (6).

1.8.3. **Prelievo e trasporto dell'acqua superficiale**

Il sito di campionamento dove prelevare l'acqua superficiale deve essere scelto in funzione dell'obiettivo del saggio in una determinata situazione. Nella scelta dei siti occorre considerare la storia dei possibili apporti di origine agricola, industriale o domestica. Se è risaputo che un ambiente acquatico è stato contaminato dalla sostanza di prova o da analoghi strutturali nei quattro anni precedenti, non deve essere utilizzato per il prelievo dell'acqua di prova, a meno che la finalità esplicita del ricercatore non sia proprio l'esame della velocità di degradazione in siti già esposti. Il pH e la temperatura dell'acqua vanno misurati sul sito di prelievo. Occorre inoltre rilevare la profondità del campionamento e l'aspetto del campione di acqua (per esempio, colore e torbidità) (cfr. punto 3). È necessario misurare la concentrazione di ossigeno e il potenziale di ossido-riduzione nell'acqua e nello strato superficiale del sedimento per verificare le condizioni aerobiche, a meno che non risultino evidenti dall'aspetto e dall'esperienza acquisita con il sito. L'acqua superficiale deve essere trasportata in un contenitore perfettamente pulito. La temperatura durante il trasporto non deve superare di molto la temperatura utilizzata per il saggio; se il trasporto supera le 2-3 ore si consiglia di portare la temperatura a 4 °C. Il campione di acqua non deve tuttavia essere congelato.

▼M1

1.8.4. **Stoccaggio e preparazione dell'acqua di superficie**

Il saggio deve preferibilmente iniziare entro un giorno dal prelievo del campione. Se è necessario stoccare l'acqua, il periodo di stoccaggio deve essere ridotto al minimo e in ogni caso non può superare 4 settimane. Il campione di acqua va mantenuto ad una temperatura di 4 °C con aerazione fino al momento dell'utilizzo. Prima dell'impiego, occorre eliminare le particelle più grosse, per esempio per sedimentazione o per filtrazione con filtro in nylon con maglie di circa 100 μm o con un filtro grossolano in carta.

1.8.5. **Preparazione di acqua addizionata con sedimento (facoltativo)**

Per il saggio con sedimento in sospensione, il sedimento superficiale viene aggiunto nei flaconi contenenti acqua naturale (prefiltrata per eliminare le particelle più grossolane secondo quanto descritto al punto 1.8.4) per ottenere una sospensione. La concentrazione dei solidi sospesi deve essere compresa tra 0,01 e 1 g/l. Il sedimento superficiale deve provenire dallo stesso sito da cui è stato prelevato il campione di acqua. In funzione dell'ambiente acquatico specifico, il sedimento superficiale può essere caratterizzato da un elevato tenore di carbonio organico (2,5-7,5 %) e da una consistenza fine oppure da un basso tenore di carbonio organico (0,5-2,5 %) e da una consistenza più grossa (3). Preparazione del sedimento superficiale: estrarre varie carote di sedimento con un tubo di plastica trasparente, tagliare gli strati aerobici superiori (a partire dalla superficie fino ad una profondità massima di 5 mm) subito dopo il campionamento e riunirli. Il campione di sedimento che ne risulterà deve essere trasportato in un contenitore con un grande spazio libero superiore per mantenerlo in condizioni aerobiche (conservarlo a 4 °C se il trasporto dura più di 2-3 ore). Il campione di sedimento deve essere sospeso nell'acqua di prova con un rapporto di 1:10 e deve essere mantenuto a 4 °C con aerazione fino al momento dell'utilizzo. Se è necessario stoccare il sedimento, il periodo di stoccaggio deve essere ridotto al minimo e in ogni caso non può superare 4 settimane.

1.8.6. **Procedimento semi-continuo (facoltativo)**

Può essere necessario procedere ad un'incubazione prolungata (di vari mesi) se si verifica una fase di latenza lunga prima che si possa misurare una degradazione significativa della sostanza di prova. Se questa condizione è già nota da precedenti saggi eseguiti sulla sostanza, è possibile iniziare il saggio con un procedimento semi-continuo, che permette di rinnovare periodicamente una parte dell'acqua o della sospensione utilizzata nel saggio (cfr. appendice 2). In alternativa, il normale saggio in discontinuo può diventare una prova semi-continua se non viene rilevata alcuna degradazione della sostanza di prova per circa 60 giorni con il procedimento in discontinuo (cfr. punto 1.8.8.3, secondo paragrafo).

1.8.7. **Aggiunta della sostanza di prova (o di riferimento)**

Per le sostanze ad elevata solubilità in acqua (> 1 mg/l) e a bassa volatilità (costanti di Henry < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ o < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$), si può preparare una soluzione madre (stock solution) in acqua deionizzata (cfr. punto 1.8.2) e aggiungerne il volume adeguato ai recipienti di prova fino ad ottenere la concentrazione desiderata. Il volume dell'eventuale soluzione madre addizionata deve essere mantenuto al livello minimo raggiungibile (< 10 % del volume liquido finale, se possibile). Un'altra possibilità consiste nel dissolvere la sostanza di prova in una quantità maggiore di acqua di prova: questa alternativa permette di non utilizzare solventi organici.

▼M1

Se non è possibile evitarlo, si devono preparare soluzioni madre di sostanze non volatili e scarsamente solubili in acqua utilizzando un solvente organico volatile; il solvente aggiunto non deve, tuttavia, superare l'1 % v/v e non deve presentare effetti negativi sull'attività microbica. Il solvente non deve incidere sulla stabilità della sostanza di prova nell'acqua. Deve inoltre essere strippato in una quantità estremamente limitata in modo da non incrementare in maniera significativa la concentrazione del DOC dell'acqua o della sospensione utilizzata per il saggio. Questa situazione viene verificata con un'analisi specifica della sostanza o, se possibile, ad un'analisi del DOC (6). È necessario limitare la quantità di solvente trasferita allo stretto necessario e garantire che la quantità di sostanza di prova possa dissolversi nel volume finale di acqua di prova. È possibile utilizzare altre tecniche per introdurre la sostanza di prova nei recipienti di prova, come descritto nei riferimenti 7 e 8. Se viene utilizzato un solvente organico per applicare la sostanza di prova i controlli con solvente contenenti l'acqua di prova (senza aggiunte) e l'acqua di prova con la sostanza di riferimento addizionata devono essere trattati come recipienti di prova attivi addizionati con la sostanza di prova in un vettore solvente. I controlli con solvente servono a verificare eventuali effetti negativi causati dal solvente alla popolazione microbica evidenziati dalla degradazione della sostanza di riferimento.

1.8.8. **Condizioni di prova**

1.8.8.1. *Temperatura di prova*

L'incubazione deve avvenire (preferibilmente) al buio o in presenza di luce diffusa a una temperatura controllata (± 2 °C), che può essere la temperatura sul campo o una temperatura standard di 20-25 °C. Per temperatura sul campo si può intendere o la temperatura effettiva del campione al momento del campionamento o la temperatura media sul campo nel sito di campionamento.

1.8.8.2. *Agitazione*

Per mantenere le particelle e i microrganismi in sospensione è necessario agitarli o mescolarli continuamente. L'agitazione agevola anche il trasferimento dell'ossigeno dallo spazio libero superiore al liquido per mantenere adeguatamente le condizioni aerobiche. Collocare i flaconi su una tavola vibrante (agitazione pari a circa 100 gpm) o utilizzare un agitatore magnetico. L'agitazione deve essere continua ma il più delicata possibile e deve riuscire a mantenere la sospensione omogenea.

1.8.8.3. *Durata del saggio*

In genere il saggio non dovrebbe durare più di 60 giorni, a meno di non utilizzare la procedura semi-continua rinnovando periodicamente la sospensione di prova (cfr. punto 1.8.6 e appendice 2). La durata del saggio in discontinuo può tuttavia essere prolungata fino ad un massimo di 90 giorni se la degradazione della sostanza ha avuto inizio entro i primi 60 giorni. La degradazione è monitorata a intervalli di tempo adeguati, determinando l'attività residua del ^{14}C o il $^{14}CO_2$ formatosi (cfr. punto 1.8.9.4) e/o procedendo ad analisi chimica (punto 1.8.9.5). Il tempo di incubazione deve essere sufficientemente lungo da permettere di valutare il processo di degradazione. La degradazione dovrebbe preferibilmente essere superiore al 50 %; per le sostanze a degradazione lenta l'entità della degradazione deve essere sufficiente (in genere superiore al 20 %) a stimare la costante cinetica di velocità di degradazione.

▼M1

È necessario effettuare misure periodiche del pH e della concentrazione di ossigeno nel sistema di saggio, a meno che esperienze precedenti derivate da saggi analoghi con campioni di acqua e di sedimento prelevati dallo stesso sito non le rendano superflue. In presenza di determinate condizioni, il metabolismo dei substrati primari a concentrazioni molto più elevate nell'acqua o nel sedimento può portare ad una formazione di CO_2 e ad una riduzione di ossigeno tali da modificare sensibilmente le condizioni sperimentali del saggio.

1.8.9. **Procedimento**

1.8.9.1. *Preparazione dei flaconi per il saggio pelagico*

Trasferire un volume adeguato di acqua di prova nei flaconi (massimo un terzo del volume del flacone, ma non meno di 100 ml circa). Se si utilizzano flaconi multipli (per raccogliere flaconi interi ad ogni campionamento) il volume giusto di acqua di prova è ancora pari a circa 100 ml, perché volumi ridotti possono influenzare la durata della fase di latenza. La sostanza di prova addizionata proviene da una soluzione madre (cfr. punti 1.8.2 e 1.8.7.). Per determinare la cinetica di degradazione e calcolare la costante cinetica di velocità di degradazione è necessario utilizzare la sostanza di prova ad almeno due diverse concentrazioni che si differenziano di un fattore compreso tra 5 e 10. Le due concentrazioni prescelte devono essere inferiori a 100 μg/l e comprese, preferibilmente, nell'intervallo < 1-10 μg/l.

Chiudere i flaconi con tappi o coperchi ermetici all'aria e al CO_2. Per le sostanze chimiche di prova non volatili e non marcate con ^{14}C si consiglia di utilizzare tappi di cotone idrofilo per impedire la contaminazione con aria (cfr. punto 1.8.1) purché si sappia con certezza che gli eventuali prodotti di degradazione principali non siano volatili e si proceda alla determinazione indiretta del CO_2 (cfr. appendice 3).

Incubare i flaconi alla temperatura prescelta (cfr. punto 1.8.8.1). Ritirare i campioni per procedere all'analisi chimica o alla misura del ^{14}C all'inizio del saggio (cioè prima che inizi la biodegradazione; cfr. punto 1.7.1) e successivamente ad intervalli di tempo adeguati per tutta la durata del saggio. Il campionamento può avvenire per rimozione di sotto-campioni (per esempio aliquote di 5 ml) da ciascun campione replicato o prelevando i flaconi interi ad ogni campionamento. La mineralizzazione della sostanza di prova può essere determinata direttamente o indirettamente (cfr. appendice 3). Di solito sono necessari almeno cinque punti di campionamento durante la fase di degradazione (cioè al termine della fase di latenza) per stimare una costante di velocità affidabile, a meno che non si riesca a dimostrare che tre punti di campionamento sono sufficienti per le sostanze a degradazione rapida. Per le sostanze a degradazione lenta è facile effettuare più misure durante la fase di degradazione e pertanto si devono utilizzare più punti di dati per stimare la costante k. Non è possibile stabilire tempi fissi per il campionamento vista la variabilità della velocità di biodegradazione; se la degradazione è lenta, si raccomanda tuttavia un campionamento a settimana. Se invece la sostanza di prova è a degradazione rapida, si deve effettuare un campionamento al giorno per i primi tre giorni e successivamente a giorni alterni o ogni due giorni. In alcuni casi, per esempio per le sostanze che idrolizzano molto rapidamente, può essere necessario effettuare campionamenti a intervalli orari. Prima del saggio si raccomanda di procedere a uno studio preliminare per determinare gli intervalli di campionamento adatti. Se servono campioni per effettuare altre analisi specifiche, si consiglia di prelevarne di più e di scegliere quali sottoporre ad analisi al termine dell'esperimento secondo una strategia a ritroso: in altri termini, gli ultimi campioni sono analizzati per primi (per indicazioni sulla stabilità dei campioni in fase di stoccaggio cfr. il punto 1.8.9.5, secondo paragrafo).

▼M1

1.8.9.2. *Numero di flaconi e di campioni*

Preparare un numero sufficiente di flaconi in modo da avere a disposizione:

— flaconi per la prova; almeno flaconi replicati per ciascuna concentrazione della sostanza di prova (preferibilmente almeno 3) o flaconi multipli per ogni concentrazione se vengono raccolti flaconi interi a ciascun campionamento (contrassegnati dal simbolo F_T),

— flaconi per il calcolo del bilancio di massa; almeno flaconi replicati per ciascuna concentrazione di prova (contrassegnati dal simbolo F_M),

— controllo in bianco, nessuna sostanza di prova: almeno un flacone in bianco contenente solo l'acqua di prova (contrassegnato dal simbolo F_B),

— controllo di riferimento; flaconi replicati con la sostanza di riferimento (per esempio anilina o benzoato di sodio a 10 µg/l) (contrassegnati dal simbolo F_C). Il controllo di riferimento serve a confermare una minima attività microbica. Se conveniente è possibile utilizzare una sostanza di riferimento radiomarcata, anche nel caso in cui la degradazione della sostanza di prova sia monitorata con analisi chimica,

— controllo sterile; uno o due flaconi contenenti acqua di prova sterilizzata per esaminare l'eventuale degradazione abiotica o un altro tipo di eliminazione non biologica della sostanza di prova (contrassegnati dal simbolo F_S). L'attività biologica può essere interrotta ponendo l'acqua di prova in autoclave (a 121 °C per 20 min) oppure aggiungendo un tossico [per esempio sodio azide (NaN_3) a 10-20 g/l, cloruro di mercurio ($HgCl_2$) a 100 mg/l o formalina a 100 mg/l] o ancora con radiazioni gamma. Se si utilizza $HgCl_2$ deve essere smaltito come rifiuto tossico. Se all'acqua viene aggiunto un ingente quantitativo di sedimento non è semplice ottenere condizioni di sterilità; in tal caso si raccomanda di ripetere l'operazione di sterilizzazione in autoclave (per esempio tre volte). Si consideri che le caratteristiche di assorbimento-adsorbimento del sedimento possono risultare alterate da questa operazione,

— controlli con solvente, contenenti acqua di prova e acqua di prova con sostanza di riferimento; flaconi replicati trattati con la stessa quantità di solvente e seguendo lo stesso procedimento utilizzato per l'applicazione della sostanza di prova. In questo modo s'intende verificare gli eventuali effetti negativi del solvente determinando la degradazione della sostanza di riferimento.

Nel concepire il saggio il ricercatore deve considerare l'importanza relativa di una maggiore replicazione sperimentale rispetto all'aumento del numero dei momenti di campionamento. Il numero esatto di flaconi necessari dipenderà dal metodo utilizzato per misurare la degradazione (cfr. punto 1.8.9.1, terzo paragrafo, punto 1.8.9.4 e appendice 3).

▼M1

Per ciascun momento di campionamento da ciascun flacone devono essere prelevati due sottocampioni (per esempio aliquote di 5 ml). Se vengono impiegati flaconi multipli per prelevare i flaconi interi, almeno due flaconi devono essere sacrificati per ciascun momento di campionamento (cfr. punto 1.8.9.1, primo paragrafo).

1.8.9.3. *Preparazione dei flaconi per il saggio con sedimento in sospensione [facoltativo]*

Aggiungere, se richiesto, i volumi necessari di acqua di prova e sedimento ai recipienti utilizzati nel saggio (cfr. punto 1.8.5). Preparare i flaconi per il saggio con sedimento in sospensione seguendo lo stesso procedimento del saggio pelagico (cfr. punti 1.8.9.1 e 1.8.9.2). Utilizzare preferibilmente bottiglie di siero o flaconi di forma analoga. Collocare i flaconi chiusi su un agitatore in posizione orizzontale. I flaconi aperti per le sostanze non marcate con ^{14}C e non volatili devono essere naturalmente collocati in posizione verticale; in questo caso si consiglia di procedere all'agitazione magnetica utilizzando barre magnetiche rivestite di vetro. Se necessario, aerare le bottiglie per conservare le condizioni aerobiche necessarie.

1.8.9.4. *Determinazione radiochimica*

Il $^{14}CO_2$ che si forma può essere misurato direttamente o indirettamente (cfr. appendice 3). Per via indiretta viene misurato determinando la differenza tra l'attività iniziale del $^{14}CO_2$ nell'acqua di prova o nella sospensione e l'attività residua totale al momento del campionamento misurata dopo l'acidificazione del campione (fino a ottenere un pH 2-3) e lo strippaggio del CO_2. Il carbonio inorganico viene così eliminato e l'attività residua misurata è data dal materiale organico. Non si procede alla determinazione indiretta del $^{14}CO_2$ se durante la trasformazione della sostanza di prova si formano notevoli metaboliti volatili (cfr. appendice 3). Se possibile la formazione di $^{14}CO_2$ deve essere misurata direttamente (appendice 3) al momento di ciascun campionamento in almeno un flacone di prova; con questo procedimento è possibile verificare il bilancio di massa e il processo di biodegradazione, ma solo nei saggi che utilizzano flaconi chiusi.

In caso di misurazione diretta del $^{14}CO_2$ nel corso del saggio, è necessario preparare un maggior numero di flaconi a tal fine all'inizio del saggio stesso. È consigliabile misurare il $^{14}CO_2$ per via diretta se durante la trasformazione della sostanza di prova si formano notevoli metaboliti volatili. In ciascun punto di misurazione i flaconi supplementari vengono acidificati (pH 2-3) e il $^{14}CO_2$ viene raccolto in un assorbitore interno o esterno (cfr. appendice 3).

In via facoltativa è possibile determinare la concentrazione della sostanza di prova marcata con ^{14}C e i principali metaboliti con la tecnica della radiocromatografia (per esempio cromatografia su strato sottile o TLC, la cromatografia RAD-TLC) o della cromatografia HPLC con rivelatore radiochimico.

È inoltre facoltativo determinare la distribuzione di fase della radioattività rimanente (cfr. appendice 1) e la sostanza di prova e i metaboliti residui.

▼M1

Al termine del saggio il bilancio di massa deve essere determinato con la misurazione diretta del $^{14}CO_2$ utilizzando flaconi separati dai quali nel corso del saggio non è stato prelevato alcun campione (cfr. appendice 3).

1.8.9.5. *Analisi chimica specifica*

Se è disponibile un metodo analitico specifico sensibile, è possibile determinare la biodegradazione primaria misurando la concentrazione residua totale della sostanza di prova, senza ricorrere alle tecniche di radiomarcatura. Se viene utilizzata una sostanza di prova radiomarcata (per misurare la mineralizzazione totale), parallelamente è possibile effettuare analisi chimiche specifiche che offrono utili informazioni supplementari e permettono di verificare il procedimento. Le analisi chimiche specifiche possono essere utili anche per misurare i metaboliti che si formano durante la degradazione della sostanza di prova: questo procedimento è consigliabile per le sostanze mineralizzate con tempi di emivita superiori a 60 giorni. È necessario misurare la concentrazione della sostanza di prova e i metaboliti al momento di ciascun campionamento e riferire i dati ottenuti (sotto forma di concentrazione e di percentuale della sostanza applicata). In generale, i metaboliti rilevati in percentuale ≥ 10 % della concentrazione applicata al momento del campionamento devono essere identificati, a meno di fondate ragioni per non farlo. Occorre valutare la possibilità di identificare anche i metaboliti le cui concentrazioni aumentano continuamente nel corso dello studio, anche se tali concentrazioni non superano il limite indicato precedentemente, perché questo elemento potrebbe essere indice di persistenza. Occorre valutare la possibilità di procedere all'analisi dei metaboliti in controlli sterili se si ritiene possibile una trasformazione abiotica rapida della sostanza di prova (per esempio nel caso dell'idrolisi). È necessario valutare caso per caso se sia necessario quantificare e identificare i metaboliti, motivando le scelte nella relazione. Le tecniche di estrazione con solvente organico devono essere applicate secondo le indicazioni fornite nel rispettivo procedimento analitico.

Tutti i campioni devono essere stoccati a 2-4 °C e in condizioni ermetiche se l'analisi viene effettuata nel giro di 24 ore (ipotesi da privilegiare). Se lo stoccaggio si prolunga, i campioni devono essere congelati a temperature inferiori a – 18 °C o devono essere conservati chimicamente. Non è consigliabile procedere all'acidificazione per conservare i campioni, perché in quel caso i campioni possono risultare instabili. Se i campioni non sono analizzati entro 24 ore e devono essere stoccati più a lungo, è necessario svolgere uno studio sulla stabilità allo stoccaggio per dimostrare la stabilità delle sostanze chimiche interessate ad una temperatura di stoccaggio inferiore a – 18 °C o in condizioni di conservazione. Se il metodo di analisi prevede l'estrazione con solvente o l'estrazione in fase solida (SPE), l'estrazione deve avvenire immediatamente dopo il campionamento o lo stoccaggio del campione refrigerato per un massimo di 24 ore.

In base alla sensibilità del metodo di analisi potrebbe essere necessario utilizzare campioni di volume superiore a quello indicato al paragrafo 1.8.1. Il saggio può essere svolto facilmente con volumi di prova di un litro in flaconi da 2-3 litri, che permettono di prelevare campioni di circa 100 ml.

▼M1

2. **DATI E RELAZIONI**

2.1. TRATTAMENTO DEI RISULTATI

2.1.1. **Rappresentazione dei dati**

Arrotondare i tempi di campionamento ad un numero intero di ore (a meno che la sostanza non si degradi in maniera consistente in un periodo variabile tra minuti e ore), ma non ad un numero intero di giorni. Indicare le stime dell'attività residua della sostanza di prova (per le sostanze marcate con ^{14}C) o la concentrazione residua (per le sostanze non marcate), rispetto al tempo in un grafico lineare e in un grafico semi-logaritmico (cfr. figure 1a e 1b). Se è avvenuta la degradazione, comparare i risultati dei flaconi F_T con quelli dei flaconi F_S. Se le medie dei risultati ricavati dai flaconi con la sostanza di prova (F_T) e dai flaconi sterili (F_S) divergono di meno del 10 %, si può ritenere che la degradazione osservata è prevalentemente abiotica. Se la degradazione nei flaconi F_S è inferiore, i risultati possono essere utilizzati per correggere quelli ottenuti con i flaconi F_T (per sottrazione) per stimare l'entità della degradazione. Nel caso in cui vengano effettuate analisi facoltative per i principali metaboliti, oltre al grafico relativo alla scomparsa della sostanza di prova, è necessario fornire i grafici relativi alla formazione e alla scomparsa dei metaboliti.

Stimare la durata della fase di latenza t_L dalla curva di degradazione (grafico semi-logaritmico) estrapolando la parte lineare fino alla degradazione zero o, in alternativa, determinando il tempo necessario per ottenere circa il 10 % della degradazione (cfr. figure 1a e 1b). In base al grafico semi-logaritmico, stimare la costante di velocità del 1° ordine, k, e l'errore standard con la regressione lineare di ln (attività residua del ^{14}C o concentrazione della sostanza di prova) rispetto al tempo. In particolare con le misure del ^{14}C utilizzare solo i dati che appartengono alla parte lineare iniziale della curva dopo la fase di latenza e, di preferenza, selezionare pochi dati rappresentativi piuttosto che una grande quantità di dati più incerti. In questo caso l'incertezza comprende errori inerenti all'uso diretto raccomandato delle attività residue del ^{14}C rilevate (cfr. sotto). A volte può essere utile calcolare due diverse costanti di velocità se la degradazione segue un modello bifasico. A tal fine vengono definite due diverse fasi della curva di degradazione. Effettuare il calcolo della costante k e dell'emivita $t_{½} = \ln 2/k$ per ciascuno dei singoli flaconi replicati quando dallo stesso flacone vengono prelevati sottocampioni, oppure applicando i valori medi quando sono raccolti interi flaconi per ciascun momento di campionamento (cfr. l'ultimo paragrafo del punto 1.8.9.2). Se si utilizza la prima procedura è necessario riportare la costante di velocità e l'emivita per ciascuno dei singoli flaconi replicati e un valore medio con un errore standard. Se sono state utilizzate concentrazioni elevate della sostanza di prova, la curva di degradazione può discostarsi notevolmente da una retta (grafico semi-logaritmico) e la cinetica del 1° ordine può non risultare valida. In tal caso non ha senso definire un'emivita. Tuttavia, per un intervallo di dati limitato, è possibile applicare una cinetica di pseudo-1° ordine e stimare il tempo di dimezzamento DT_{50} (cioè il tempo necessario a raggiungere una degradazione del 50 %). Occorre tuttavia ricordare che, utilizzando il DT_{50}, non è possibile prevedere la durata della degradazione oltre l'intervallo di dati selezionato, perché il DT_{50} non è altro che un descrittore di una determinata serie di dati. Gli strumenti analitici che agevolano il calcolo statistico e l'aggiustamento della curva sono facilmente disponibili e si raccomanda pertanto di utilizzare questo tipo di software.

▼M1

Se si effettuano analisi chimiche specifiche, stimare le costanti di velocità e i tempi di emivita per la degradazione primaria come indicato in precedenza nel caso della mineralizzazione totale. Se la degradazione primaria è il processo limitante, talvolta è possibile utilizzare i punti di dati dell'intera degradazione, perché le misure sono dirette, al contrario di quanto avviene con le misure dell'attività del ^{14}C.

Se si utilizzano sostanze marcate con ^{14}C il bilancio di massa deve essere espresso in percentuale della concentrazione iniziale applicata, almeno alla fine del saggio.

2.1.2. **Attività residua**

Quando la parte marcata con ^{14}C di una sostanza organica è biodegradata, la parte più consistente del ^{14}C è convertita in $^{14}CO_2$, mentre un'altra parte è utilizzata per la crescita di biomassa e/o per la sintesi di metaboliti extra-cellulari. La biodegradazione «completa» di una sostanza non produce pertanto una conversione al 100 % del carbonio in $^{14}CO_2$. Il ^{14}C integrato nei prodotti formatisi per biosintesi è successivamente rilasciato lentamente sotto forma di $^{14}CO_2$ a causa della «mineralizzazione secondaria». Per questi motivi la rappresentazione grafica dell'attività residua del ^{14}C organico (misurata dopo strippaggio del CO_2) o del $^{14}CO_2$ prodotto rispetto al tempo indicherà un fenomeno di «coda» (tailing) dopo che la biodegradazione sarà ultimata. Questa situazione rende più complessa l'interpretazione cinetica dei dati e, a tal fine, in genere per stimare la costante di velocità di degradazione si deve utilizzare solo la parte iniziale della curva (dopo la conclusione della fase di latenza e prima che sia raggiunto il 50 % circa della degradazione). Se la sostanza di prova è degradata, l'attività totale residua del ^{14}C organico è sempre più elevata dell'attività del ^{14}C associata alla sostanza di prova che rimane intatta. Se la sostanza di prova è degradata con una reazione del 1° ordine e una frazione costante α è mineralizzata in CO_2, la pendenza iniziale della curva di scomparsa del ^{14}C (^{14}C organico totale rispetto al tempo) sarà α volte la pendenza della corrispondente curva della concentrazione della sostanza di prova (o, più precisamente, della parte della sostanza di prova marcata con ^{14}C). Se si utilizzano le misure dell'attività totale del ^{14}C organico senza correzioni, la costante di velocità di degradazione calcolata risulterà espressa per difetto. Le procedure per stimare le concentrazioni della sostanza di prova dalle attività radiochimiche misurate sulla base di varie ipotesi semplificatrici sono state descritte nei riferimenti 2, 9, 10, 11. Tali procedure sono applicabili più facilmente nel caso di sostanze a degradazione rapida.

2.2. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Se risulta che k non è funzione della concentrazione addizionata (cioè se la costante k calcolata è indicativamente uguale a concentrazioni diverse della sostanza di prova) si può ipotizzare che la costante di velocità del 1° ordine è rappresentativa delle condizioni di prova impiegate, cioè la sostanza di prova, il campione di acqua e la temperatura di prova. Un giudizio esperto deve valutare se i risultati possono essere generalizzati o estrapolati ad altri sistemi. Se si utilizza una concentrazione elevata della sostanza di prova e dunque la degradazione non segue una cinetica del 1° ordine, non è possibile utilizzare i dati per la stima diretta di una costante di velocità del 1° ordine o un'emivita corrispondente. Tuttavia, i dati ricavati da una prova a concentrazioni elevate della sostanza di prova possono comunque essere utilizzati per stimare la mineralizzazione totale e/o per rilevare e quantificare i metaboliti.

▼M1

Se si conoscono le velocità di altri processi di perdita diversi dalla biodegradazione (per esempio l'idrolisi o la volatilizzazione), questi valori possono essere sottratti dalla velocità netta della perdita osservata durante il saggio e ottenere una stima approssimativa della velocità di biodegradazione. I dati relativi all'idrolisi possono essere ottenuti, per esempio, da un controllo sterile o da una prova parallela applicando una concentrazione più elevata della sostanza di prova.

La determinazione diretta e indiretta del $^{14}CO_2$ (punto 1.8.9.4 e appendice 3) può essere utilizzata solo per misurare l'entità della mineralizzazione della sostanza di prova in CO_2. La radiocromatografia (RAD-TLC) o l'HPLC possono essere utilizzate per analizzare le concentrazioni della sostanza di prova marcata con ^{14}C e la formazione dei principali metaboliti (punto 1.8.9.4, terzo paragrafo). Per una stima diretta dell'emivita è necessario che non siano presenti importanti metaboliti (definiti come quelli che rappresentano una percentuale $\geq$ 10 % della quantità applicata di sostanza di prova). Se sono presenti metaboliti nella quantità indicata nella definizione, occorre una valutazione dettagliata dei dati, che può comprendere la ripetizione del saggio e/o l'individuazione dei metaboliti (cfr. punto 1.8.9.5, primo paragrafo), a meno che non si possa ragionevolmente determinare il destino dei metaboliti in base all'esperienza (per esempio con informazioni sulla via di degradazione). Poiché la proporzione di carbonio presente nella sostanza di prova che viene convertita in CO_2 è variabile (soprattutto in funzione della concentrazione della sostanza di prova e di altri substrati disponibili, delle condizioni della prova e della comunità microbica), questo saggio non consente di stimare direttamente la biodegradazione completa come avviene nel saggio con esaurimento del carbonio organico disciolto (DOC die-away test), ma il risultato è analogo a quello ottenuto mediante test respirometrico. Il grado di mineralizzazione sarà pertanto uguale o simile al livello minimo di biodegradazione completa. Per avere un quadro più completo della biodegradazione completa (mineralizzazione e incorporazione nella biomassa) l'analisi della distribuzione di fase del ^{14}C deve avvenire al termine del saggio (cfr. appendice 1). Il ^{14}C nel pool del particolato sarà dato dal ^{14}C incorporato nella biomassa batterica e dal ^{14}C adsorbito o assorbito nelle particelle organiche.

2.3. VALIDITÀ DEL SAGGIO

Se la sostanza di prova non viene degradata nell'intervallo di tempo previsto (per l'anilina e il benzoato di sodio si tratta, in genere, di meno di due settimane) la validità del saggio deve ritenersi dubbia e deve essere ulteriormente verificata; in alternativa, è necessario ripetere il saggio con un nuovo campione d'acqua. In una prova interlaboratorio (ring-test) ISO del metodo al quale hanno partecipato sette laboratori di tutta Europa, le costanti di velocità di degradazione adattate per l'anilina variavano da 0,3 a 1,7 giorni^{-1} con una media di 0,8 $g^{-1\ a\ 20}$ °C e un errore standard di ± 0,4 g^{-1} ($t_{½}$ = 0,9 giorni). I tempi di latenza tipici variavano tra 1 e 7 giorni. Le acque esaminate presentavano una biomassa batterica di 10^3-10^4 unità formanti colonie (CFU) per ml. Le velocità di degradazione nelle acque dell'Europa centrale, ricche in nutrienti, erano superiori a quelle delle acque oligotrofiche dell'Europa settentrionale: questo dato può essere dovuto al diverso stato trofico delle acque o a una precedente esposizione a sostanze chimiche.

Il recupero totale (bilancio di massa) al termine dell'esperimento dovrebbe oscillare tra il 90 % e il 110 % per le sostanze radiomarcate, mentre il recupero iniziale all'inizio dell'esperimento dovrebbe essere compreso tra il 70 % e il 110 % per le sostanze non marcate. Questi intervalli devono tuttavia essere interpretati come obiettivi e non essere considerati dei criteri per l'accettazione del saggio.

▼M1

3. **RELAZIONE DI PROVA**

Nella relazione di prova deve essere indicato chiaramente il tipo di studio condotto, cioè saggio pelagico o con sedimento in sospensione, oltre che le informazioni minime riportate di seguito.

Sostanza di prova e sostanza(e) di riferimento:

— denominazioni comuni, nomi chimici (si raccomanda di indicare le denominazioni IUPAC e/o CAS), numeri CAS, formule di struttura (indicando la posizione del ^{14}C se si utilizzano sostanze radiomarcate) e le pertinenti proprietà fisico-chimiche della sostanza di prova e della sostanza di riferimento (cfr. punti 1.5 e 1.6),

— nomi chimici, numeri CAS, formule di struttura (indicando la posizione del ^{14}C se si utilizzano sostanze radiomarcate) e le pertinenti proprietà fisico-chimiche delle sostanze utilizzate come standard per l'identificazione e la quantificazione dei metaboliti,

— purezza (impurità) delle sostanze di prova e di riferimento,

— purezza radiochimica della sostanza marcata e attività specifica (se pertinente).

Acqua superficiale:

Per il campione di acqua prelevato è necessario fornire le seguenti informazioni minime:

— ubicazione e descrizione del sito di campionamento e, se possibile, cronistoria della contaminazione,

— data e ora in cui è stato prelevato il campione,

— nutrienti (N totale, ammonio, nitriti, nitrati, P totale, ortofosfato disciolto),

— profondità alla quale è stato prelevato il campione,

— aspetto del campione (per esempio, colore e torbidità),

— DOC e TOC,

— BOD,

— temperatura e pH nel luogo e al momento del prelievo,

— ossigeno o potenziale di ossido-riduzione (obbligatorio solo se le condizioni aerobiche non sono evidenti),

— salinità o conduttività (in caso di acque di mare o salmastre),

— solidi in sospensione (se il campione è torbido),

— eventualmente, altre informazioni attinenti sul punto di campionamento al momento del prelievo (per esempio dati effettivi o storici sulla portata dei fiumi o sulle correnti marine, sulle principali fonti di emissioni/scarichi eventualmente presenti nelle vicinanze e sui tipi di scarichi, sulle condizioni meteorologiche verificatesi prima del campionamento).

In via facoltativa è possibile indicare le seguenti informazioni:

— biomassa microbica (per esempio conteggio diretto con arancio-acridina o unità formanti colonie),

▼M1

— carbonio inorganico,

— concentrazione di clorofilla *a* utilizzata per la stima specifica della biomassa algale.

Se viene eseguito il saggio con sedimento in sospensione devono essere fornite le seguenti informazioni sul sedimento:

— profondità a cui è stato prelevato il sedimento,

— aspetto del sedimento (colorato, fangoso, limoso o sabbioso),

— consistenza (per esempio % di sabbia grossa, sabbia fine, limo e argilla),

— peso secco in g/l di solidi in sospensione, concentrazione di TOC o perdita di peso alla combustione come indicazione del contenuto di materia organica,

— pH,

— ossigeno o potenziale di ossido-riduzione (obbligatorio solo se le condizioni aerobiche non risultano evidenti).

Condizioni della prova:

— tempo intercorso tra il prelievo del campione e l'utilizzo nel saggio in laboratorio, stoccaggio e pretrattamento del campione, date di esecuzione degli studi,

— quantità di sostanza applicata, concentrazione di prova e sostanza di riferimento,

— metodo di applicazione della sostanza di prova, compreso l'eventuale uso di solventi,

— volume di acqua superficiale utilizzata e di sedimento (eventuale) e volume campionato ad ogni intervallo ai fini dell'analisi,

— descrizione del sistema di saggio applicato,

se il saggio non avviene al buio, fornire informazioni sulle condizioni di «luce diffusa»,

— informazioni sul o sui metodi utilizzati per procedere a controlli sterili (per esempio temperatura, tempo e numero di sterilizzazioni in autoclave),

— temperatura di incubazione,

— informazioni sulle tecniche di analisi e sui metodi utilizzati per le misure radiochimiche e per il controllo del bilancio di massa e la misura della distribuzione di fase (se effettuata),

— numero di misure replicate.

Risultati:

— percentuali di recupero (cfr. punto 1.7.1),

— ripetibilità e sensibilità dei metodi analitici applicati, compreso il limite di rilevabilità (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ) (cfr. punto 1.7.2),

▼M1

— tutti i dati misurati (comprese le ore dei campionamenti) e i valori calcolati in formato tabulare e le curve di degradazione; per ogni concentrazione di prova e flacone replicato riportare il coefficiente di correlazione lineare per la pendenza del grafico logaritmico, la fase di latenza stimata e una costante di velocità del 1° ordine o di pseudo-1° ordine (se possibile), nonché il corrispondente tempo di dimezzamento di degradazione (o emivita, t_{50}),

— riportare i valori pertinenti sotto forma di medie dei risultati osservati nei singoli campioni replicati, per esempio la lunghezza della fase di latenza, la costante di velocità di degradazione e il tempo di dimezzamento di degradazione (o il t_{50}),

— classificare il sistema come non adattato o adattato in base all'andamento della curva di degradazione e della possibile influenza della concentrazione di prova,

— i risultati del controllo finale del bilancio di massa e i risultati delle eventuali misure della distribuzione di fase,

— la frazione di ^{14}C mineralizzata e, in caso di analisi specifiche, il livello finale di degradazione primaria,

— l'identificazione, la concentrazione molare e la percentuale di prodotti applicati e dei principali metaboliti (cfr. punto 1.8.9.5, primo paragrafo), se del caso,

— eventualmente, una possibile via di trasformazione,

— un commento sui risultati.

4. **BIBLIOGRAFIA**

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test

2. ISO/DIS 14592-1 (1999), *Water quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations — Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions*.

3. Metodo di prova C.23. Trasformazione aerobica e anaerobica nel suolo.

4. Metodo di prova C.24. Trasformazione aerobica e anaerobica nei sistemi sedimentosi acquatici.

5. OCSE (1993), *Guidelines for the Testing of Chemicals*, OCSE, Parigi.

6. ISO 8245 (1999), *Water quality — Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC)*.

7. ISO 10634 (1995), *Water quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium*.

8. OCSE progetto (2000), *Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment*, n. 22.

▼**M1**

9. Simkins, S. e Alexander, M. (1984), «Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density», *Appl. Environ. Microbiol*. n. 47, pagg. 394-401.

10. Ingerslev, F. e N. Nyholm, (2000), «Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems», *Ecotoxicol. Environ. Saf*. n. 45, pagg. 274-283.

11. ISO/CD 14592-1 (1999), *Ring test report: Water Quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 — report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions*.

▼M1

Appendice 1

Distribuzione di fase del ^{14}C

Per verificare il procedimento, le misure di routine dell'attività totale residua del ^{14}C organico (TOA) devono essere integrate da misure del bilancio di massa con la determinazione diretta del $^{14}CO_2$ formatosi dopo intrappolamento in un assorbitore (cfr. appendice 3). Di per sé, una formazione di $^{14}CO_2$ costituisce una prova diretta della biodegradazione rispetto alla degradazione abiotica o ad altri meccanismi di perdita, come la volatilizzazione e l'assorbimento/adsorbimento. Altre informazioni utili che caratterizzano il comportamento di biodegradabilità si ottengono misurando la distribuzione della TOA tra stato disciolto (attività del ^{14}C organico disciolto, DOA) e stato particolato (attività del ^{14}C organico particolato, POA) dopo separazione del particolato per filtrazione a membrana o centrifugazione. La POA è data dalla sostanza di prova sorbita dalla biomassa microbica e da altre particelle oltre al carbonio della sostanza di prova utilizzato per la sintesi di nuovo materiale cellulare e dunque incorporato nella frazione particellare della biomassa. La formazione di materiale con ^{14}C organico disciolto può essere stimata come DOA al termine della biodegradazione (linea orizzontale sulla curva degradazione-tempo).

Stimare la distribuzione di fase del ^{14}C residuo in determinati campioni filtrandoli con un filtro a membrana con porosità di 0,22 μm o 0,45 μm realizzato con un materiale che non adsorba quantitativi ingenti di sostanza di prova (i filtri di policarbonato possono essere i più adatti). Se l'assorbimento/adsorbimento della sostanza di prova nel filtro è troppo consistente per essere ignorato (fattore da verificare prima del saggio), al posto della filtrazione è possibile utilizzare la centrifugazione ad alta velocità (2 000 g, 10 min).

Procedere con il filtrato o centrifugato secondo quanto descritto all'appendice 3 per i campioni non filtrati. Dissolvere i filtri a membrana in un fluido di scintillazione adeguato e procedere al conteggio secondo le modalità consuete, usando in genere solo il metodo del rapporto standard esterno per compensare il fenomeno del quenching (attenuazione) oppure usare un ossidante del campione. Se è stata utilizzata la centrifugazione, rimettere in sospensione il pellet formato dalla frazione di particolato in 1-2 ml di acqua distillata e trasferirlo in una fiala da scintillazione. Successivamente, procedere a un doppio lavaggio con 1 ml di acqua distillata e trasferire l'acqua di lavaggio nella fiala. Se necessario, la sospensione può essere incorporata in un gel per il conteggio in scintillazione liquida.

▼M1

Appendice 2

Procedimento semi-continuo

Per raggiungere una degradazione sufficiente di sostanze recalcitranti può essere necessaria un'incubazione prolungata che può durare fino a vari mesi. In genere il saggio non dovrebbe durare più di 60 giorni, a meno che non si riesca a mantenere le caratteristiche del campione di acqua originario rinnovando la sospensione di prova. La durata del saggio può tuttavia essere prolungata fino ad un massimo di 90 giorni senza rinnovo della sospensione di prova se la degradazione della sostanza di prova è iniziata entro i primi 60 giorni.

Se l'incubazione si prolunga per lungo tempo, la diversità della comunità microbica può diminuire a causa di vari meccanismi di perdita e alla possibile riduzione di nutrienti essenziali e dei substrati di carbonio primari presenti nel campione di acqua. Per determinare la velocità di degradazione di sostanze a degradazione lenta si raccomanda pertanto di procedere ad un saggio semi-continuo. Il saggio deve iniziare con un procedimento semi-continuo se, in base ad esperienze precedenti, si ritiene che sarà necessario un periodo di incubazione di tre mesi per raggiungere una degradazione della sostanza pari al 20 %. In alternativa, il normale saggio in discontinuo potrà essere trasformato in un saggio semi-continuo se nel giro di circa 60 giorni di saggio con la procedura in discontinuo non c'è stata degradazione. La procedura semi-continua può essere arrestata e il saggio può continuare in discontinuo quando si registra una degradazione notevole (per esempio > 20 %).

Nel saggio semi-continuo ogni due settimane circa un terzo del volume della sospensione di prova viene sostituito da acqua appena prelevata alla quale è addizionata la sostanza di prova alla concentrazione iniziale. Analogamente, se viene eseguito il saggio facoltativo con sedimento in sospensione, viene aggiunto anche sedimento all'acqua di sostituzione alla concentrazione iniziale (compresa tra 0,01 e 1 g/l). Nell'esecuzione del saggio con sedimenti solidi in sospensione, è importante mantenere un sistema completamente in sospensione anche quando l'acqua viene rinnovata; inoltre, il tempo di residenza deve essere lo stesso per i solidi e per l'acqua, altrimenti si può perdere la similarità con il sistema acquatico omogeneo, senza fasi fisse, che si intende riprodurre. Per questo motivo, nel caso della procedura semi-continua, è preferibile che la concentrazione iniziale dei sedimenti in sospensione si attesti nell'intervallo più basso indicato.

L'aggiunta di sostanza di prova che viene richiesta implica che la concentrazione iniziale della sostanza di prova non deve essere superata dal rinnovo parziale della sospensione di prova e, dunque, che si deve evitare l'adattamento, che si riscontra di frequente in presenza di concentrazioni elevate della sostanza di prova. Poiché la procedura comprende sia la re-inoculazione che la compensazione per la riduzione dei nutrienti e dei substrati primari, la diversità microbica originaria viene ripristinata e la durata del saggio può essere prolungata, in teoria, all'infinito. In caso di procedura semi-continua è importante ricordare che la concentrazione residua della sostanza di prova deve essere corretta in funzione dei quantitativi di sostanza di prova addizionati o eliminati nel corso di ciascuna procedura di rinnovo. La concentrazione totale e la concentrazione della sostanza di prova disciolta possono essere utilizzate in maniera intercambiabile per i composti con basso grado di assorbimento/adsorbimento. L'assorbimento/adsorbimento è insignificante (< 5 %) alle condizioni indicate (0,1-1 g solidi/l) per le sostanze con log Kow < 3 (valido per composti neutri, lipofilici), come si può notare dal seguente esempio. 0,1 g/l di solidi corrispondono a circa 10 mg di carbonio per litro (frazione di carbonio, f_C = 0,01). Se:

Log K_{ow} (della sostanza di prova) = 3

K_{oc}= 0,42 × K_{ow}

Coefficiente di partizione, $K_d = f_C \times K_{oc}$

la frazione disciolta della concentrazione totale [C-acqua (C_w)/C-totale (C_t)] pari a:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \text{ x } 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Appendice 3

Determinazione del $^{14}CO_2$

Determinazione indiretta del $^{14}CO_2$

Per le misure di routine, il metodo indiretto è in genere quello che richiede meno tempo e il più preciso se la sostanza di prova non è volatile e non si trasforma in metaboliti volatili. È sufficiente trasferire campioni non filtrati (per esempio di 5 ml) in fiale da scintillazione. All'inizio un'attività adeguata nei campioni è compresa tra 5 000 dpm e 10 000 dpm (80-170 Bq) e l'attività iniziale minima è pari a circa 1 000 dpm. Il CO_2 deve essere strippato dopo acidificazione (pH 2-3) con 1 o 2 gocce di H_3PO_4 o di HCl concentrato. Lo strippaggio del CO_2 può essere eseguito insufflando aria per circa ½-1 ora. In alternativa, è possibile agitare vigorosamente le fiale per 1-2 ore (per esempio su un agitatore a micropiastre) oppure procedere ad un'agitazione più delicata per tutta una notte. È necessario verificare l'efficienza dello strippaggio del CO_2 (prolungando l'aerazione o l'agitazione). Successivamente aggiungere un liquido di scintillazione adatto a conteggiare i campioni acquosi; omogeneizzare il campione in miscelatore rotante e determinare la radioattività tramite conteggio in scintillazione liquida e sottraendo l'attività di fondo riscontrata nei bianchi di prova (F_B). A meno che l'acqua di prova non sia molto colorata o contenga concentrazioni elevate di particelle, in genere i campioni presenteranno un quenching (attenuazione) uniforme e sarà sufficiente apportare correzioni all'attenuazione utilizzando uno standard esterno. Se l'acqua di prova è molto colorata, può essere necessario procedere alla correzione con uno standard interno. Se la concentrazione delle particelle è elevata, potrebbe non essere possibile ottenere una soluzione o un gel omogenei, oppure la variazione di attenuazione tra un campione e l'altro potrebbe essere notevole. In tal caso si può utilizzare il metodo di conteggio descritto per i fanghi. Se il saggio viene effettuato sotto forma di saggio con sedimento in sospensione, si può misurare indirettamente il $^{14}CO_2$ prendendo un campione omogeneo di 10 ml dell'acqua/sospensione di prova e separarne le fasi per centrifugazione a velocità adeguata (per esempio 40 000 m/s^2 per 15 min). La fase acquosa deve successivamente essere trattata come descritto in precedenza. L'attività del ^{14}C organico particolato — POA — deve essere determinata mediante ri-sospensione del sedimento in poca acqua distillata, che deve essere successivamente trasferita nelle fiale da scintillazione con l'aggiunta di liquido di scintillazione per formare un gel (a tal fine esistono in commercio liquidi speciali). In base al tipo di particelle (per esempio al loro contenuto di materiale organico) può essere fattibile digerire il campione in una notte con un solubilizzatore in tessuto e successivamente procedere all'omogeneizzazione in un miscelatore rotante prima di aggiungere il liquido di scintillazione. In alternativa, la POA può essere determinata tramite combustione in eccesso di ossigeno utilizzando un ossidante del campione. Al momento del conteggio è sempre necessario includere standard interni e può essere necessario effettuare correzioni dell'attenuazione aggiungendo standard interni per ogni singolo campione.

Determinazione diretta del $^{14}CO_2$

Se il $^{14}CO_2$ formatosi viene misurato direttamente, occorre preparare vari flaconi all'inizio del saggio, prelevarli in ciascun punto di misura acidificandoli (pH 2-3) e raccogliendo il $^{14}CO_2$ in un assorbitore interno (collocato in ogni flacone di prova all'inizio del saggio) o esterno. Come mezzo di assorbimento è possibile utilizzare un mezzo alcalino (per esempio una soluzione di 1N di NaOH o un pellet di NaOH), etanolammina, un assorbitore a base di etanolammina oppure assorbitori reperibili sul mercato. Per la misurazione diretta del $^{14}CO_2$, i flaconi devono essere chiusi, per esempio con tappi in gomma di butile.

▼**M1**

Figura 1a

Esempio di rappresentazione aritmetica dei dati (attività residua rispetto al tempo)

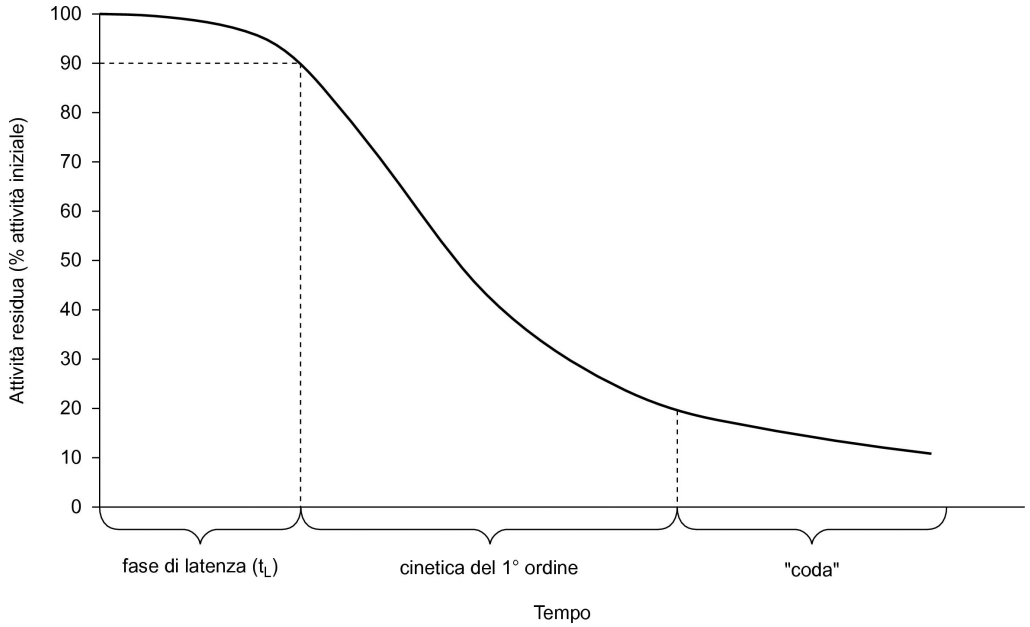
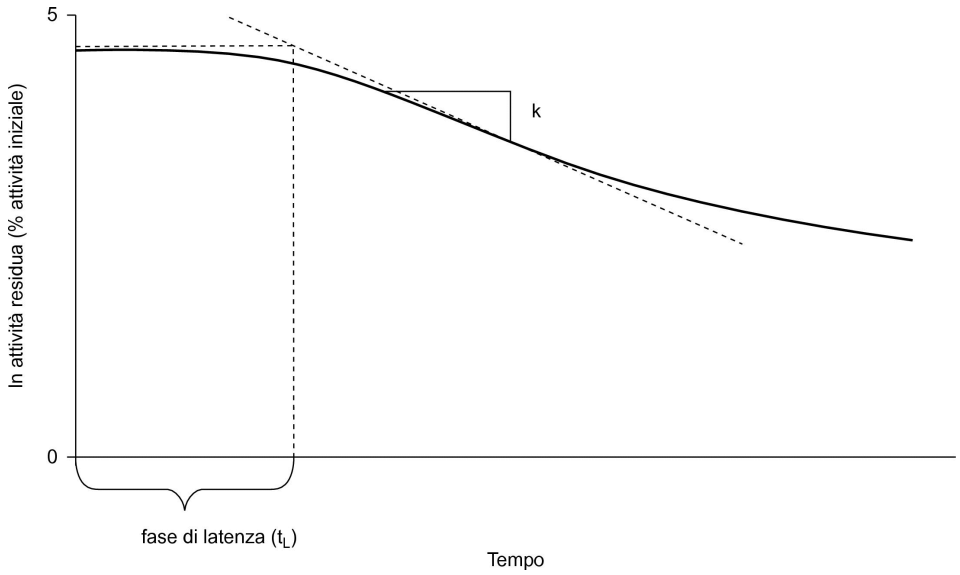


Figura 1b

Esempio di grafico semi-logaritmico (ln attività residua rispetto al tempo)



▼M6

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

INTRODUZIONE

1. 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 EC_{50}).

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_rC_{50}).

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_yC_{50}).

▼M6

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 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 saggiando 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

▼M6

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 $NaHCO_3$ 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.

▼M6

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 $\leq$ 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 EC_{50}, la concentrazione di prova più alta deve essere superiore al valore EC_{50}. Se il valore EC_{50} 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

▼M6

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 $\mu E \cdot m^{-2}s^{-1}$, 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, ± 15 %. Il metodo di rilevamento e misurazione della luce, in particolare il tipo di sensore, inciderà sul valore

▼M6

misurato. I sensori sferici (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);

▼M6

(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 ± 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 ± 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 ± 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 ± 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).

▼M6

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_rC_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

▼M6

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 (Ir) può essere successivamente calcolata per ciascuna concentrazione di prova (gruppo trattato) secondo la formula seguente:

▼M6

$$\%\ I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

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_rC_x) sia sul rendimento (E_yC_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_rC_x (numero di fronde); E_rC_x (area totale delle fronde, peso secco o pesco fresco); E_yC_x (numero di fronde); e E_yC_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

▼M6

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,

▼**M6**

— 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);

— tempio 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 EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, 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).

▼M6

(5) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 — 120 pp.

(6) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

(7) Sims I., Whitehouse P. and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.

(8) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(9) International Organisation for Standardisation. ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test.

(10) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.

(11) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353 — 359.

(12) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.

(13) Christensen, E.R.,, Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19, 713-718.

(14) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11, 157-167.

(15) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.

(16) OECD. (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

(17) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(18) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

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

(20) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(21) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 519-531.

(22) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼M6

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 saggiata 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.

▼M6

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.

▼M6

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., Czyrska, 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

▼**M6**

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: lemna@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.

▼M6

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 sottocolture 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 tagliano 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.

▼M6

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 *Lemna* 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.

Soluzione 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_2PO_4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4. 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2 - EDTA $2H_2O$	0,28	1,4	-	-
VII	MOPS (tampone)	490	490	-	-

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

▼**M6**

— 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 ± 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 ± 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 suindicato.

Soluzione 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
	$MgCl_2.6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2.2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2 \cdot O$	1,4	30	K;P	9,4;3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2.4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3.6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66

▼M6

Soluzione madre	Sostanza	Concentrazione nella soluzione madre (g/l) (*)	Concentrazione nel mezzo preparato (mg/l) (*)	Mezzo preparato	
				Elemento	Concentrazione (mg/l) (*)
	$Na_2EDTA.2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	$CoCl_2.6H_2O$	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	$CuCl_2.2H_2O$	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
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41

▼**M6**

Componente		Mezzo nutriente	
Microelementi	Peso molare	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
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_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Soluzione madre 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Soluzione madre 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tabella 3

Soluzioni madre (microelementi)

2. Microelementi (1 000 volte più concentrati)	**mg/l**
Soluzione madre 4:	
H_3BO_3	120,0
Soluzione madre 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Soluzione madre 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Soluzione madre 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Soluzione madre 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	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).

▼**M6**

— 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.

▼**M4**

C.27. **PROVA DI TOSSICITÀ SU CHIRONOMIDE IN ACQUA-SEDIMENTO CON SEDIMENTO ADDIZIONATO**

▼**M10**

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 3 della parte 0.

▼**M4**

C.28. **PROVA DI TOSSICITÀ SU CHIRONOMIDI IN SEDIMENTO-ACQUA CON ACQUA ADDIZIONATA**

▼**M10**

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 3 della parte 0.

▼M4

C.29. PRONTA BIODEGRADABILITÀ — CO_2 IN RECIPIENTI ERMETICI (prova del CO_2 nello spazio di testa)

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida OCSE n. 310 (2006). Si tratta di un metodo di screening che consente di valutare la pronta biodegradabilità delle sostanze chimiche e che fornisce informazioni analoghe ai sei metodi di prova descritti nel capitolo C.4 del presente allegato (da A a F). Pertanto, una sostanza chimica che risulta positiva a questo metodo di prova può essere considerata prontamente biodegradabile e quindi rapidamente biodegradabile nell'ambiente.

2. L'ormai consolidato metodo del biossido di carbonio (CO_2) (1), basato sul test originale di Sturm (2) che permette di valutare la biodegradabilità delle sostanze chimiche organiche misurando il biossido di carbonio prodotto dall'attività microbica, è in genere quello che meglio si presta a saggiare le sostanze chimiche poco solubili e quelle fortemente adsorbenti. È utilizzato anche per le sostanze solubili (ma non volatili), poiché molti ritengono che lo sviluppo di biossido di carbonio sia l'unica prova inequivocabile dell'attività microbica. L'eliminazione del carbonio organico disciolto può avvenire mediante processi fisico-chimici (adsorbimento, volatilizzazione, precipitazione, idrolisi), nonché ad opera dell'azione microbica e di molte reazioni non biologiche che consumano ossigeno; è raro che il CO_2 sia prodotto a partire da prodotti chimici organici per via abiotica. Nel test di Sturm originale e in quello modificato (1) (2), il CO_2 è estratto dalla fase liquida ed inviato negli assorbitori per gorgogliamento (ossia insufflando nel mezzo liquido l'aria trattata per eliminare il CO_2), mentre nella versione di Larson (3) (4) è trasferito dal reattore agli assorbitori facendo passare nello spazio di testa un flusso d'aria priva di CO_2 e, in più, agitando il reattore in continuo. Solo nella versione modificata di Larson il reattore viene agitato; l'agitazione è prescritta solo per le sostanze insolubili nella norma ISO 9439 (5) e nella versione originale degli Stati Uniti (6), entrambe le quali prescrivono il gorgogliamento invece della sostituzione dell'aria nello spazio di testa. In un altro metodo ufficiale dell'agenzia statunitense per la protezione dell'ambiente (US EPA) (7), che si basa sul metodo di Gledhill (8), il reattore agitato è chiuso ermeticamente e il CO_2 prodotto è raccolto direttamente dalla fase gassosa in una trappola alcalina interna, come nel respirometro classico di Warburg/Barcroft.

3. È stato tuttavia dimostrato, nell'applicazione della prova standard modificata di Sturm a varie sostanze chimiche (9), che il carbone inorganico si accumula nel mezzo. Nella degradazione di 20 mg C/l di anilina, ad esempio, si è osservata una concentrazione di carbonio inorganico dell'ordine di 8 mg/l, da cui si è desunto che la raccolta di CO_2 nelle trappole alcaline non rispecchia la quantità reale di CO_2 prodotta dall'azione microbica nelle fasi intermedie della degradazione. Pertanto, la prescrizione secondo la quale, per poter classificare la sostanza in esame come prontamente biodegradabile, è necessario raggiungere una produzione di CO_2 superiore al 60 % della produzione massima teorica ($ThCO_2$) nella fase di crescita di 10 giorni («time window», ossia i 10 giorni immediatamente successivi al raggiungimento della soglia del 10 % di biodegradazione) non è rispettata nel caso di alcune sostanze chimiche che rientrerebbero in questa categoria utilizzando come criterio l'eliminazione del carbonio organico disciolto (DOC).

4. Quando la degradazione percentuale è inferiore al valore previsto, è probabile che una quantità di carbonio inorganico si sia accumulata nella soluzione di prova. La degradabilità può allora essere valutata tramite le altre prove di pronta biodegradabilità.

▼M4

5. Altri inconvenienti del metodo di Sturm (laboriosità, tempi lunghi, propensione a errori sperimentali e non applicabilità alle sostanze chimiche volatili) avevano già indotto i ricercatori ad orientarsi verso una tecnica con recipienti ermetici, diversa da quella di Gledhill, prescindendo dall'uso di un flusso di gas continuo (10) (11). Boatman *et al.* (12) hanno riveduto i primi metodi e hanno adottato un sistema con spazio di testa chiuso, in cui il CO_2 è liberato nello spazio di testa alla fine dell'incubazione mediante acidificazione del mezzo. Il CO_2 era misurato per gascromatografia/analisi del carbonio inorganico in campioni prelevati automaticamente dallo spazio di testa, senza però tenere conto del carbonio inorganico disciolto (DIC) nella fase liquida. Inoltre, i recipienti utilizzati erano molto piccoli (20 ml) e contenevano soltanto 10 ml di mezzo, il che era fonte di problemi, ad esempio quando si aggiungevano quantità necessariamente molto piccole di sostanze chimiche insolubili, e/o per il fatto che il mezzo inoculato rischiava di non contenere affatto i microrganismi in grado di degradare le sostanze in esame o di contenerli in un numero insufficiente.

6. Tali problemi sono stati risolti dagli studi indipendenti di Struijs e Stoltenkamp (13) e di Birch e Fletcher (14), questi ultimi ispirati dalla loro esperienza con le apparecchiature utilizzate nella prova di biodegradazione anaerobica (15). Nel primo metodo (13) il CO_2 era misurato nello spazio di testa dopo l'acidificazione e l'equilibrazione, mentre nel secondo (14) il DIC era misurato nelle fasi gassosa e liquida, senza trattamento; più del 90 % del carbonio inorganico formatosi era presente nella fase liquida. Entrambi i metodi presentavano vantaggi rispetto al test di Sturm: poggiavano su un sistema sperimentale più compatto e maneggevole, si applicavano anche alle sostanze chimiche volatili ed evitavano che la misurazione del CO_2 prodotto fosse ritardata.

7. I due approcci sono stati combinati nella norma ISO sul CO_2 nello spazio di testa (16), che è stata sottoposta a prove interlaboratorio (17) e costituisce la base del presente metodo di prova. Essi sono stati anche utilizzati nel metodo dell'EPA (18). Sono stati raccomandati due metodi di misurazione del CO_2: il CO_2 nello spazio di testa dopo acidificazione (13) e il carbonio inorganico nella fase liquida dopo l'aggiunta di un agente alcalino in eccesso. Quest'ultimo è stato introdotto da Peterson nel corso della prova interlaboratorio, condotta da CONCAWE (19), del presente metodo dello spazio di testa modificato, per misurare la biodegradabilità intrinseca. Nel 1992 è stata effettuata una revisione dei metodi di cui al capitolo C.4 del presente allegato per la pronta biodegradabilità (20) e le modifiche apportate in quella sede sono state integrate nel metodo di prova qui descritto, cosicché le condizioni (mezzo, durata ecc.) sono per il resto identiche a quelle del test di Sturm riveduto (20). Birch e Fletcher (14) hanno dimostrato che, sulle stesse sostanze, la prova dello spazio di testa dava risultati molto simili a quelli della prova interlaboratorio condotta dall'OCSE (21) dei metodi di prova riveduti.

PRINCIPIO DEL METODO

8. La sostanza chimica in esame, normalmente a una concentrazione di 20 mg C/l e unica fonte di carbonio ed energia, è incubata in un tampone a base di sali minerali in cui è stata inoculata una popolazione mista di microrganismi. La prova è eseguita in bottiglie ermeticamente chiuse contenenti aria nello spazio di testa, che costituisce una riserva di ossigeno per la biodegradazione aerobica. Si determina il CO_2 sviluppatosi dalla biodegradazione aerobica completa della sostanza in esame misurando la quantità eccedente di carbonio inorganico prodotta nelle bottiglie rispetto a quella prodotta nelle bottiglie di controllo, che contengono solo il mezzo inoculato. Il grado di biodegradazione è espresso come percentuale della produzione massima teorica di carbonio inorganico (ThIC), in base alla quantità di sostanza chimica in esame (in carbonio organico) aggiunta all'inizio.

9. È anche possibile misurare l'eliminazione del DOC e/o il grado di biodegradazione primaria della sostanza chimica in esame (20).

▼M4

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

10. Per poter calcolare la percentuale di degradazione occorre conoscere il tenore (% del peso) di carbonio organico della sostanza chimica in esame, desumendolo dalla sua struttura chimica oppure misurandolo. Per le sostanze volatili, è utile misurare o calcolare la costante di Henry per determinare un rapporto adeguato tra il volume dello spazio di testa e quello di liquido. Le informazioni sulla tossicità della sostanza in esame per i microrganismi aiutano a scegliere la concentrazione sperimentale adatta e a interpretare i risultati quando indicano 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 microbica (cfr. paragrafo 24).

APPLICABILITÀ DEL METODO

11. La prova si applica alle sostanze chimiche idrosolubili e insolubili, purché la sostanza in esame sia ben dispersa. Se per il rapporto volumico spazio di testa/liquido si applica il rapporto raccomandato di 1:2, le sostanze volatili la cui costante di Henry non supera 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$ possono essere saggiate, poiché la porzione di sostanza in esame nello spazio libero non sarà superiore all'1 % (13). Si può utilizzare uno spazio di testa di volume inferiore per saggiare sostanze chimiche più volatili, la cui biodisponibilità rischia tuttavia di essere limitante soprattutto se sono poco idrosolubili. L'operatore deve però assicurarsi che il rapporto volumico spazio di testa/liquido e la concentrazione della sostanza in esame lascino ossigeno in quantità sufficiente da permettere il compiersi di una biodegradazione aerobica completa (evitando, ad esempio, di usare un substrato molto concentrato e uno spazio di testa ridotto). Ulteriori orientamenti a questo proposito si trovano nei riferimenti bibliografici (13) e (23).

SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

12. Occorre verificare il procedimento sperimentale saggiando in parallelo una sostanza di riferimento la cui biodegradabilità sia nota. A tal fine si può ricorrere all'anilina, al benzoato di sodio o al glicol etilenico quando si saggiano sostanze chimiche idrosolubili, e all'1-ottanolo quando si saggiano sostanze chimiche poco solubili (13). La biodegradazione di queste sostanze deve essere superiore al 60 % della ThIC dopo 14 giorni.

RIPRODUCIBILITÀ

13. Dalla prova interlaboratorio del metodo realizzata dall'ISO (17) sono emersi i seguenti risultati, ottenuti applicando le condizioni raccomandate, ivi compresa la concentrazione della sostanza in esame pari a 20 mg C/l.

Sostanza chimica in esame	Percentuale media di biodegradazione (28 giorni)	Coefficiente di variazione (%)	Numero di laboratori
Anilina	90	16	17
1-ottanolo	85	12	14

Con l'anilina, la variabilità interna della prova (riproducibilità) è risultata bassa, con coefficienti di variabilità non superiori a 5 % in quasi tutte le prove. Nei due casi con peggiore riproducibilità, la causa è probabilmente una produzione elevata di carbonio inorganico nei controlli. La riproducibilità con l'1-ottanolo ha dato risultati meno soddisfacenti, risultando comunque inferiore al 10 % nel 79 % delle prove. Questa maggiore variabilità interna della prova potrebbe derivare da errori di dosaggio, dato che il volume di 1-ottanolo da iniettare nelle bottiglie era assai piccolo (3 to 4 µl). Si osservano coefficienti di variazione più alti quando si utilizzano concentrazioni più deboli della sostanza in esame, in particolare al di sotto di 10 mg C/l. Si può in parte ovviare a questo inconveniente riducendo la concentrazione del carbonio inorganico totale (TIC) nell'inoculo.

▼M4

14. Una prova interlaboratorio, organizzata dall'UE (24), di cinque tensioattivi a una concentrazione di 10 mg C/l ha dato i seguenti risultati:

Sostanza chimica in esame	Percentuale media di biodegradazione (28 giorni)	Coefficiente di variazione (%)	Numero di laboratori
Tetrapropilenbenzene solfonato	17	45	10
Di-isoottilsulfosuccinato (anionico)	72	22	9
Cloruro di esadecil-trimetilammonio (*) (cationico)	75	13	10
Isononilfenolo(etossillato)$_9$ (non ionico)	41	32	10
Cocoamidopropil dimetilidrossi sulfobetaina (anfotero)	60	23	11

(*) Il SiO_2 è stato aggiunto per neutralizzare la tossicità.

Dai risultati si ricava che in generale la variabilità è maggiore per i tensioattivi meno degradabili. La variabilità interna della prova è stata inferiore al 15 % in più del 90 % dei casi, senza mai superare il 30-40 %.

NB: La maggior parte dei tensioattivi non sono specie molecolari semplici bensì miscele di isomeri, omologhi ecc. che degradano dopo periodi di latenza diversi e a diverse velocità cinetiche, dando luogo a curve poco nette, attenuate, cosicché la soglia del 60 % rischia di non essere raggiunta nell'arco dei 10 giorni, anche se ogni singola specie molecolare, se saggiata isolatamente, la raggiungerebbe. Questo fenomeno può essere osservato anche con altre miscele complesse.

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiatura

15. Normale attrezzatura da laboratorio e:

a) bottiglie da siero, chiuse ermeticamente con tappi di butile e ghiere di alluminio. La capacità raccomandata è di 125 ml, ossia un volume totale di circa 160 ml (nel qual caso il volume noto di ciascuna bottiglia deve essere di 160 ± 1 ml). Si possono utilizzare bottiglie più piccole se i risultati soddisfano le condizioni di cui ai paragrafi 66 e 67;

b) analizzatore di carbonio o altro strumento (ad esempio, gascromatografo) per misurare il carbonio inorganico;

▼M4

c) siringhe ad alta precisione per i campioni gassosi e liquidi;

d) agitatore orbitale in ambiente termostatato;

e) flusso d'aria priva di CO_2 — può esser preparata facendo passare un flusso d'aria attraverso granuli di calce sodata o impiegando una miscela gassosa costituita da 80 % di N_2 e 20 % di 0_2 (facoltativo) (cfr. paragrafo 28);

f) dispositivo di filtrazione su membrana con porosità da 0,20 a 0,45 μm (facoltativo);

g) analizzatore di carbonio organico (facoltativo).

Reagenti

16. Impiegare sempre reagenti di grado analitico.

Acqua

17. Utilizzare acqua distillata o deionizzata con contenuto totale di carbonio organico ≤ 1 mg/l. Questo valore rappresenta una quantità ≤ 5 % del tenore iniziale di carbonio organico introdotto dalla dose raccomandata della sostanza chimica in esame.

Soluzioni madre per il mezzo a base di sali minerali

18. Le soluzioni madre e il mezzo a base di sali minerali sono simili a quelli della norma ISO 14593 (16) e delle prove di «pronta biodegradabilità» descritte nel capitolo C.4 (20). Una concentrazione più alta di cloruro di ammonio (2,0 g/l invece di 0,5 g/l) è da usarsi solo in casi molto eccezionali, ad esempio quando la concentrazione della sostanza in esame eccede i 40 mg C/l. Le soluzioni madre devono essere conservate al freddo e per non più di sei mesi, o per meno tempo se si osserva una precipitazione o una proliferazione microbica. Preparare le soluzioni madre seguenti:

a) diidrogenofosfato di potassio (KH_2PO_4) 8,50 g

idrogenofosfato di potassio (K_2HPO_4) 21,75 g

sodio idrogenofosfato diidrato ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g

cloruro d'ammonio (NH_4Cl) 0,50 g

Sciogliere in acqua e portare a 1 litro. Questa soluzione deve avere un pH pari a 7,4 (± 0,2). Se così non fosse, preparare una nuova soluzione;

b) cloruro di calcio diidrato ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g

Sciogliere in acqua e portare a 1 litro;

c) solfato di magnesio eptaidrato ($Mg_2SO_4.7H_20$) 22,50 g

Sciogliere in acqua e portare a 1 litro;

d) cloruro di ferro (III) esaidrato ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g

Sciogliere in acqua portando a 1 litro e aggiungere una goccia di HCl concentrato.

Preparazione del mezzo minerale

19. Mescolare 10 ml di soluzione (a) con 800 ml di acqua (paragrafo 17), aggiungere 1 ml delle soluzioni (b), (c) e (d) e portare a 1 litro con acqua (paragrafo 17).

Altri reagenti

20. Acido fosforico concentrato (H_3PO_4) (> 85 % massa per volume).

▼M4

Soluzione di idrossido di sodio 7M

21. Sciogliere 280 g di idrossido di sodio (NaOH) in 1 litro di acqua (paragrafo 17). Determinare la concentrazione di DIC di questa soluzione e tenere conto di questo valore nel calcolo del risultato della prova (cfr. paragrafi 55 e 61), in particolare alla luce del criterio di validità di cui al paragrafo 66, lettera b). Preparare una nuova soluzione se la concentrazione di DIC è troppo alta.

Sostanza chimica in esame

22. Preparare una soluzione madre di una sostanza chimica sufficientemente solubile in acqua (paragrafo 17) oppure nel mezzo di prova (paragrafo 19), a una concentrazione di preferenza 100 volte superiore alla concentrazione finale da utilizzarsi nella prova; può essere necessario aggiustare il pH della soluzione madre. La soluzione madre deve essere aggiunta al mezzo minerale in modo da ottenere una concentrazione finale di carbonio organico tra 2 e 40 mg C/l. di preferenza 20 mg C/l. Concentrazioni più basse rischiano di diminuire la precisione. Le sostanze liquide solubili e insolubili possono essere introdotte direttamente nei recipienti con siringhe ad alta precisione. Le sostanze chimiche poco solubili e insolubili possono richiedere un trattamento speciale (25), da scegliere tra i seguenti:

a) aggiunta diretta delle aliquote pesate note;

b) dispersione ultrasonica prima dell'aggiunta;

c) dispersione con l'ausilio di agenti emulsionanti di cui occorre stabilire, prima dell'aggiunta, se esercitano un effetto inibitorio o stimolante sull'attività microbica;

d) adsorbimento della sostanza in esame liquida, o di una soluzione della sostanza in esame in un solvente volatile adeguato, su un mezzo o un supporto inerte (ad esempio un filtro in fibra di vetro), seguito dall'evaporazione del solvente, se utilizzato, e dall'aggiunta diretta delle aliquote note;

e) introduzione in un recipiente vuoto di un'aliquota nota di una soluzione della sostanza chimica in esame in un solvente facilmente volatile, seguita da evaporazione del solvente.

Occorre saggiare gli agenti o i solventi di cui alle lettere c), d) ed e) per verificare se hanno un effetto stimolante o inibitorio sull'attività microbica [cfr. paragrafo 42, lettera b)].

Sostanze chimiche di riferimento

23. Preparare una soluzione madre della sostanza chimica di riferimento (solubile) in acqua (paragrafo 17), a una concentrazione di preferenza 100 volte superiore alla concentrazione finale (20 mg C/l) da utilizzarsi nella prova.

Verifica dell'inibizione

24. Si osserva spesso che le sostanze chimiche in esame non si degradano in modo significativo nelle condizioni sperimentali stabilite nelle prove per valutare la pronta biodegradazione. Ciò potrebbe essere causato dal fatto che la sostanza in esame esercita un effetto inibitore sull'inoculo alla concentrazione alla quale è saggiata. Il disegno sperimentale può prevedere una verifica dell'effetto inibitore, per facilitare l'individuazione (in retrospettiva) dell'inibizione come causa possibile o fattore concomitante, oppure, al contrario, per dissipare questa ipotesi e mostrare che la degradazione debole o nulla è imputabile unicamente al fatto che i microrganismi non attaccano la sostanza nelle condizioni in cui è condotta la prova. Per ottenere informazioni sulla tossicità della sostanza chimica in esame per i microrganismi (aerobici), preparare una soluzione nel mezzo di prova contenente la sostanza in esame e la sostanza di riferimento (paragrafo 19), ciascuna alle stesse concentrazioni utilizzate nel mezzo di prova (cfr. paragrafi 22 e 23).

▼M4

Inoculo

25. L'inoculo può essere di varia origine: fanghi attivi, acqua di scarico (non clorata), acque superficiali e terreni, oppure da una miscela di questi elementi (20). Occorre verificare l'attività di biodegradazione dell'origine utilizzando una sostanza chimica di riferimento. Indipendentemente dall'origine, non utilizzare microrganismi che sono già stati esposti alla sostanza in esame se il procedimento è destinato a una prova per determinare la pronta biodegradabilità.

Attenzione: il fango attivo e l'acqua di scarico contengono organismi patogeni e devono essere manipolati con cautela.

26. In base all'esperienza acquisita, il volume ottimale dell'inoculo è quello che soddisfa le seguenti condizioni:

— è sufficiente a fornire un'adeguata attività di biodegradazione,

— degrada la sostanza chimica di riferimento alla percentuale prestabilita (cfr. paragrafo 66),

— fornisce da 10^2 a 10^5 unità formanti colonie per millilitro nella miscela finale,

— dà luogo normalmente a una concentrazione di 4 mg/l di solidi sospesi nella miscela finale quando si usa fango attivo; possono essere impiegate concentrazioni fino a 30 mg/l, tenendo presente che rischiano di aumentare notevolmente la produzione di CO_2 nei bianchi (26),

— costituisce meno del 10 % della concentrazione iniziale di carbonio organico introdotto dalla sostanza chimica in esame,

— equivale generalmente a un quantitativo compreso tra 1 ml e 10 ml di inoculo per litro di soluzione di prova.

Fango attivo

27. Raccogliere un campione di fango attivo fresco dal serbatoio di aerazione di un impianto di trattamento o da un'unità pilota di laboratorio per il trattamento delle acque di scarico che tratti prevalentemente liquami domestici. Se necessario, setacciarlo per rimuovere le particelle grossolane (con un setaccio a maglia da 1 mm^2) e mantenerlo in condizioni aerobiche sino al momento dell'uso.

28. In alternativa, far decantare o centrifugare (per esempio a 1 100 g per 10 minuti) dopo la rimozione delle eventuali particelle grossolane. Scartare il surnatante. Il fango può essere lavato nella soluzione minerale. Sospendere il fango concentrato nel mezzo minerale per ottenere una concentrazione di 3-5 g di solidi sospesi/l e aerare finché sia necessario.

29. Il fango deve essere prelevato da un impianto di trattamento convenzionale ben funzionante. Se il fango è stato prelevato da un impianto ad alta potenzialità o si ritiene contenga inibitori deve essere lavato. Decantare o centrifugare il fango risospeso dopo accurata miscelazione, scartare il surnatante e risospendere il fango lavato in un volume ulteriore di mezzo minerale. Ripetere questa procedura fino a quando il fango può essere considerato esente da substrato e inibitori in eccesso.

30. Prelevare un campione di fango risospeso (a risospensione ultimata) oppure di fango non trattato appena prima di utilizzarlo per determinare il peso secco dei solidi sospesi.

31. Un'ulteriore alternativa è quella di omogeneizzare il fango attivo (3-5 g di solidi sospesi/l). Trattare il fango in un miscelatore Waring per due minuti a velocità media. Decantare il fango miscelato per 30 minuti, o più a lungo se necessario, e utilizzare il liquido sovrastante come inoculo nel rapporto di 10 ml per litro di mezzo minerale.

▼M4

32. È possibile ottenere una riduzione ulteriore dello sviluppo di CO_2 nel bianco aerando il fango tutta una notte con aria priva di CO_2. In questa prova la concentrazione dell'inoculo deve essere pari a 4 mg/l di solidi di fanghi attivi (13).

Effluenti secondari

33. L'inoculo può provenire anche da un effluente secondario di un impianto di trattamento o da una unità pilota di laboratorio che riceve prevalentemente liquami domestici. Conservato in condizioni aerobiche, il campione può essere utilizzato il giorno del prelievo oppure può essere precondizionato, se necessario. Filtrare l'effluente con un filtro grossolano per rimuovere le parti solide più evidenti e misurarne il pH.

34. Per ridurre il tenore di carbonio inorganico del filtrato, lo si fa gorgogliare insufflandogli aria priva di CO_2 [paragrafo 15, lettera e)] per 1 ora, mantenendo il pH a 6,5 con acido fosforico (paragrafo 20). Riportare il pH al valore di partenza con dell'idrossido di sodio (paragrafo 21) e, dopo decantazione di circa 1 ora, prelevare un volume appropriato di surnatante per l'inoculo. Questa procedura riduce il tenore di carbonio inorganico nell'inoculo. Ad esempio, se si utilizza il volume massimo raccomandato di effluente filtrato e gorgogliato (100 ml) per litro come inoculo, la quantità di carbonio inorganico nei bianchi è compresa tra 0,4 e 1,3 mg/l (14), il che rappresenta da 2 % a 6,5 % del carbonio della sostanza in esame, per una concentrazione di 20 mg C/l, e da 4 % a 13 %, per una concentrazione di 10 mg C/l.

Acque superficiali

35. Da un'acqua superficiale adeguata si preleva un campione che sarà conservato in condizioni aerobiche e impiegato il giorno stesso del prelievo. Se necessario, concentrare il campione filtrandolo o centrifugandolo. Il volume dell'inoculo da utilizzare in ogni recipiente di prova deve soddisfare i criteri di cui al paragrafo 26.

Terreno

36. Prelevare un campione di terreno appropriato, a una profondità massima di 20 cm sotto la superficie del terreno. Occorre asportare le pietre, i residui di piante e gli invertebrati prima di passare il campione attraverso un setaccio con maglia di 2 mm (se il campione è troppo umido da non poter essere setacciato immediatamente, farlo asciugare parzialmente all'aria). Va conservato in condizioni aerobiche e impiegato il giorno stesso del prelievo (se il campione è trasportato in una busta di polietilene con la chiusura non ermetica può essere conservato a una temperatura compresa tra 2 °C e 4 °C nella busta stessa fino a un mese).

Precondizionamento dell'inoculo

37. L'inoculo può essere precondizionato in base alle condizioni in cui si svolgerà la prova, ma non può essere preadattato alla sostanza in esame. Il precondizionamento può diminuire lo sviluppo di CO_2 nel bianco. Il precondizionamento consiste nell'aerare il fango attivo, dopo averlo diluito nel mezzo di prova a 30 mg/l, con aria umida priva di CO_2 per un periodo fino a 5-7 giorni alla temperatura in cui si svolgerà la prova.

PROCEDURA SPERIMENTALE

Numero di bottiglie

38. Il numero delle bottiglie [paragrafo 15, lettera a)] necessarie per una prova dipenderà dalla frequenza delle analisi e dalla durata della prova.

39. Si raccomanda di effettuare l'analisi in triplicato dopo un numero di intervalli di tempo sufficiente per poter individuare la fase di crescita di 10 giorni. Alla fine della prova analizzare almeno altre cinque bottiglie sperimentali [paragrafo 15, lettera a)] delle serie a), b) e c) (cfr. paragrafo 42), per poter calcolare gli intervalli di confidenza al 95 % per la percentuale media di biodegradazione.

▼M4

Mezzo inoculato

40. L'inoculo è utilizzato a una concentrazione di 4 mg/l di solidi secchi di fango attivo. Preparare subito prima dell'uso una quantità sufficiente di mezzo inoculato aggiungendo, ad esempio, 2 ml di fango attivo opportunamente trattato (paragrafi da 27 a 32) con concentrazione di 2 000 mg/l a 1 litro di mezzo salino (paragrafo 19). Se si impiega effluenti secondari, aggiungere fino a 100 ml di effluenti (paragrafo 33) a 900 ml di mezzo salino (paragrafo 19) e portare a 1 litro con il mezzo.

Preparazione delle bottiglie

41. Versare aliquote di mezzo inoculato nelle bottiglie di ciascuna replica in modo che il rapporto spazio di testa/liquido sia di 1:2 (ad esempio, introducendo 107 ml in bottiglie dalla capacità di 160 ml). Si possono utilizzare altri rapporti, tenendo però conto dell'avvertenza di cui al paragrafo 11. Indipendentemente dal tipo di inoculo impiegato, occorre aver cura di mescolare correttamente il mezzo inoculato affinché sia distribuito uniformemente nelle bottiglie.

42. Preparare delle serie di bottiglie [paragrafo 15, lettera a)] da destinare ai seguenti usi:

f) recipienti per la prova (denominati F_T) contenenti la sostanza chimica in esame;

g) recipienti per la prova in bianco (denominati F_B) contenenti solo il mezzo di prova e l'inoculo; vanno aggiunte anche tutte le sostanze chimiche, i solventi, gli agenti o i filtri di fibra di vetro usati per introdurre la sostanza in esame nei recipienti di prova;

h) recipienti (denominati F_C) contenenti la sostanza chimica di riferimento per verificare la procedura;

i) se necessario, recipienti (denominati F_I) per verificare l'eventuale effetto inibitorio della sostanza chimica in esame, contenenti sia la sostanza in esame sia la sostanza di riferimento alle stesse concentrazioni (paragrafo 24) delle bottiglie F_T e F_C.

j) recipienti (denominati F_S) per verificare l'eventuale degradazione abiotica: si tratta di recipienti come in a) a cui si sono aggiunti 50 mg/l di $HgCl_2$ o che sono stati sterilizzati in altro modo (ad esempio, autoclave).

43. Introdurre nelle bottiglie, sotto forma di soluzioni madre acquose (paragrafi 22, 23 e 24), le sostanze chimiche solubili in esame e quelle di riferimento in modo da ottenere una concentrazione compresa tra 10 e 20 mg C/l.

44. Le sostanze chimiche insolubili in esame e di riferimento possono essere introdotte nelle bottiglie in svariati modi [cfr. paragrafo 22, lettere da a) a e)], in funzione della natura della sostanza in esame, prima o dopo l'aggiunta del mezzo inoculato, secondo il metodo di trattamento della sostanza in esame. Se si ricorre a uno dei procedimenti indicati nel paragrafo 22, lettere da a) a e), le bottiglie per il bianco F_B [paragrafo 42, lettera b)] devono essere trattate allo stesso modo, salvo non contenere la sostanza in esame o quella di riferimento.

45. Iniettare con una microsiringa le sostanze chimiche in esame volatili nelle bottiglie ermeticamente chiuse (paragrafo 47). La dose è calcolata in base al volume iniettato e alla densità della sostanza in esame.

46. Se necessario, aggiungere acqua nei recipienti affinché il volume di liquido sia identico in tutti i recipienti. Assicurarsi che il rapporto spazio di testa/liquido (normalmente di 1:2) e la concentrazione della sostanza in esame siano tali da garantire la presenza di ossigeno nello spazio di testa in quantità sufficiente a permettere la biodegradazione completa.

▼M4

47. Chiudere ermeticamente tutte le bottiglie, ad esempio con tappi di butile e ghiere di alluminio. È in questa fase che vanno aggiunte le sostanze in esame volatili (paragrafo 45). Se si deve monitorare la diminuzione della concentrazione di DOC della soluzione sperimentale e analizzare al tempo zero la concentrazione iniziale di carbonio inorganico [controlli sterili, paragrafo 42, lettera e)] o altri parametri, prelevare un campione adeguato dal recipiente di prova. Eliminare successivamente il recipiente di prova e il suo contenuto.

48. Collocare le bottiglie ermeticamente chiuse in un agitatore orbitale [paragrafo 15, lettera d)], regolato a una velocità di rotazione sufficiente a mantenere il contenuto delle bottiglie ben mescolato e in sospensione (ad esempio da 150 a 200 rpm), e incubarle al buio a temperatura costante di 20 °C (± 1 °C).

Campionamento

49. La strategia di campionamento dipende dal periodo di latenza e dalla velocità cinetica di biodegradazione della sostanza chimica in esame. Le bottiglie sono analizzate ed eliminate il giorno stesso del campionamento, che deve avvenire almeno a cadenza settimanale o più di frequente (ad esempio, due volte la settimana) se si deve definire una curva completa di degradazione. Ritirare dall'agitatore il numero necessario di repliche di ogni categoria: F_T, F_B e F_C e, se del caso, F_I e F_S (cfr. paragrafo 42). La prova dura normalmente 28 giorni. Se la curva di biodegradazione indica il raggiungimento di un plateau prima di questo termine, la prova può essere conclusa prima di 28 giorni. Prelevare dei campioni dalle cinque bottiglie destinate ad essere analizzate il 28° giorno della prova e utilizzare i risultati per calcolare gli intervalli di confidenza o il coefficiente di variazione della percentuale di biodegradazione. Le bottiglie destinate a verificare l'inibizione e la degradazione abiotica non devono essere campionate con la stessa frequenza delle altre: basteranno due prelievi, effettuati il 1° e il 28° giorno della prova.

Analisi del carbonio inorganico (IC)

50. La produzione di CO_2 nelle bottiglie è determinata misurando l'aumento della concentrazione di carbonio inorganico durante l'incubazione. Si raccomandano due metodi, descritti di seguito, per misurare la quantità di carbonio inorganico prodotta durante la prova. Poiché possono dare risultati leggermente diversi, nella stessa serie di prove si deve impiegare o l'uno o l'altro metodo.

51. Il metodo (a) è consigliato se si ritiene che il mezzo contenga residui, ad esempio di filtri in fibra di vetro e/o della sostanza in esame insolubile. Se non si dispone di un analizzatore di carbonio, l'analisi può essere eseguita con un gascromatografo. Durante l'analisi del gas nello spazio di testa è importante mantenere le bottiglie alla temperatura in cui è stata condotta la prova, o quantomeno prossime alla stessa. Il metodo (b) può essere di più facile applicazione per i laboratori che impiegano analizzatori di carbonio per misurare il carbonio inorganico. È importante che la soluzione di idrossido di sodio (paragrafo 21) utilizzata per convertire il CO_2 in carbonato sia preparata ex novo oppure che sia noto il suo tenore di carbonio inorganico, in modo da poter tenere conto di questo valore al momento di calcolare i risultati della prova [cfr. paragrafo 66, lettera b)].

Metodo (a): acidificazione a pH < 3

52. Prima di ogni lotto di analisi, l'analizzatore di carbonio inorganico è tarato con una sostanza dal tenore standard di carbonio inorganico (ad esempio una diluizione 1 % p/p di CO_2 in N_2). Iniettare l'acido fosforico concentrato (paragrafo 20) nel tappo di ogni bottiglia campionata per abbassare il pH del mezzo a un valore < 3 (ad esempio, aggiungendo 1 ml a 107 ml di mezzo di prova). Rimettere le bottiglie nell'agitatore. Dopo averle agitate per un'ora alla temperatura in cui è stata condotta la prova, togliere le bottiglie dall'agitatore, prelevare dallo spazio di testa di ciascuna bottiglia delle aliquote di gas (ad esempio, 1 ml) e iniettarle nell'analizzatore di carbonio inorganico. Annotare le concentrazioni di carbonio inorganico misurate esprimendole in mg C/l.

▼M4

53. Questo metodo verte sul principio secondo il quale dopo l'acidificazione a pH < 3 e l'equilibrazione a 20 °C, la costante di equilibrio per la ripartizione del CO_2 tra la fase liquida e la fase gassosa nelle bottiglie è pari a 1,0 se misurata sotto forma di concentrazione (13). Tale rapporto deve essere dimostrato almeno una volta per il sistema sperimentale, nel seguente modo:

allestire delle bottiglie contenenti 5 e 10 mg/l di carbonio inorganico utilizzando una soluzione di carbonato di sodio (Na_2CO_3) in acqua priva di CO_2 preparata acidificando l'acqua a pH 6,5 con acido fosforico (paragrafo 20), facendola gorgorgliare per una notte immettendo aria priva di CO_2 e portando il pH alla neutralità con alcali. Assicurarsi che il rapporto volumico tra lo spazio di testa e il liquido sia lo stesso delle prove (ad esempio 1:2). Acidificare ed equilibrare come indicato nel paragrafo 52 e misurare le concentrazioni di carbonio inorganico nello spazio di testa e nella fase liquida. Verificare che le due concentrazioni siano le stesse, nei limiti dell'errore sperimentale. Se non lo sono, riesaminare il procedimento. Non è necessario verificare la ripartizione del carbonio inorganico tra la fase liquida e quella gassosa ad ogni prova, limitandosi a farlo, ad esempio, durante la taratura.

54. Se occorre misurare l'eliminazione del DOC (unicamente per sostanze idrosolubili), prelevare campioni della fase liquida da bottiglie separate (non acidificate), filtrarli su membrana e iniettarli nell'analizzatore di carbonio organico disciolto. Queste bottiglie possono servire eventualmente per altre analisi, al fine di misurare la biodegradazione primaria.

Metodo (b): conversione del CO_2 in carbonato

55. Prima di ogni lotto di analisi, tarare l'analizzatore di carbonio inorganico mediante uno standard adeguato, ad esempio una soluzione di bicarbonato di sodio ($NaHCO_3$) in acqua priva di CO_2 (cfr. paragrafo 53) a una concentrazione di carbonio inorganico compresa tra 0 e 20 mg per litro. Iniettare una soluzione di idrossido di sodio (7M, paragrafo 21) (ad esempio, aggiungendo 1 ml a 107 ml di mezzo di prova) nel tappo di ogni bottiglia campionata e agitare le bottiglie per un'ora alla temperatura stabilita per la prova. Utilizzare la stessa soluzione di NaOH in tutte le bottiglie analizzate lo stesso giorno, ma non necessariamente in tutte le sessioni di campionamento effettuate nel corso della prova. Se occorre rilevare i valori assoluti del tenore di carbonio inorganico nei bianchi in tutte le sessioni di campionamento, si dovrà determinare il tenore di carbonio inorganico della soluzione di NaOH ogniqualvolta la si utilizza. Togliere le bottiglie dall'agitatore e farle decantare. Prelevare con un siringa da ogni bottiglia un idoneo volume della fase liquida (ad esempio, da 50 a 1 000 µl), iniettare i campioni nell'analizzatore di carbonio inorganico e prendere nota delle concentrazioni di carbonio inorganico. Assicurarsi che l'analizzatore utilizzato sia predisposto a trattare i campioni alcalini ottenuti con questo metodo.

56. Questo metodo verte sul principio secondo il quale dopo l'aggiunta di alcali e l'agitazione, la concentrazione di carbonio inorganico nello spazio di testa è trascurabile. Ciò deve essere verificato almeno una volta nel sistema sperimentale: a tal fine utilizzare gli standard di carbonio inorganico, aggiungere alcali e equilibrare, per poi misurare la concentrazione di carbonio inorganico sia nello spazio di testa che nella fase liquida (cfr. paragrafo 53). La concentrazione nello spazio di testa deve essere praticamente nulla. Non è necessario verificare l'assorbimento pressoché completo di CO_2 ad ogni prova.

57. Se occorre misurare l'eliminazione del DOC (unicamente per sostanze in esame idrosolubili), prelevare campioni della fase liquida da bottiglie separate (non contenenti alcali aggiunti), filtrarli su membrana e iniettarli nell'analizzatore di carbonio organico disciolto. Queste bottiglie possono servire eventualmente per altre analisi, al fine di misurare la biodegradazione primaria.

▼M4

DATI E RELAZIONE

Calcolo dei risultati

58. Supponendo che la sostanza in esame sia stata mineralizzata al 100 % in CO_2, la produzione massima teorica di carbonio inorganico (ThIC) delle bottiglie di prova in eccesso rispetto ai bianchi è uguale al carbonio organico totale (TOC) aggiunto ad ogni bottiglia all'inizio del saggio, ossia:

$$ThIC = TOC$$

La massa totale (mg) di carbonio inorganico (TIC) in ogni bottiglia è:

$$TIC = (\text{mg di C nel liquido} + \text{mg di C nello spazio di testa}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{equazione [1]}$$

dove:

V_L = volume di liquido nella bottiglia (litro);

CL = concentrazione di carbonio inorganico nel liquido (mg/l, espressa in carbonio);

VT = volume dello spazio di testa (litro);

CT = concentrazione di carbonio inorganico nello spazio di testa (mg/l, espressa in carbonio).

I calcoli del TIC per i due metodi d'analisi utilizzati per misurare il carbonio inorganico nella presente prova sono descritti di seguito nei paragrafi 60 e 61. La percentuale di biodegradazione (*% D*) in entrambi i casi è data dalla seguente equazione:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \quad \text{equazione [2]}$$

dove:

TIC_t = mg di TIC nella bottiglia di prova al tempo t;

TIC_b = media dei mg di TIC nelle bottiglie dei bianchi al tempo t;

TOC = mg di TOC aggiunti inizialmente alla bottiglia di prova.

La percentuale di biodegradazione (% D) è calcolata per le bottiglie di prova (F_T), quelle di riferimento (F_C) e, se del caso, quelle destinate alla verifica di un'eventuale effetto inibitore (F_I), in base alle quantità rispettive di TIC prodotte fino al momento di ogni campionamento.

59. Se si osserva un aumento significativo del tenore di TIC nei controlli sterili (F_S) durante il periodo di esecuzione della prova, si può giungere alla conclusione che si è verificata una degradazione abiotica della sostanza in esame di cui occorre tener conto nel calcolo di D nell'equazione [2].

Acidificazione a pH < 3

60. Una volta che l'acidificazione a pH < 3 e il successivo equilibrio hanno dato luogo a un'uniformazione della concentrazione di TIC nella fase liquida e in quella gassosa, basta misurare solo la concentrazione di carbonio inorganico della fase gassosa. Pertanto, in base all'equazione [1] $TIC = (V_L + V_T) \times C_T = V_B \times C_T$, dove V_B = volume della bottiglia da siero.

Conversione del CO_2 in carbonato

61. In questo metodo i calcoli sono effettuati in base all'equazione [1], ma senza tenere conto della quantità trascurabile di carbonio inorganico nella fase gassosa, in modo che $V_T \times C_T = 0$ e $TIC = V_L \times C_L$.

▼M4

Espressione dei risultati

62. Tracciare la curva della biodegradazione in un grafico in cui è rappresentata la percentuale di biodegradazione (D) in funzione del tempo di incubazione, indicando, se possibile, le fasi di latenza, biodegradazione, crescita di 10 giorni e plateau, ossia la fase in cui è stata raggiunta la degradazione massima e la curva presenta un andamento orizzontale. Se per le bottiglie di prova F_T saggiate in parallelo si sono ottenuti risultati paragonabili (differenza < 20 %), tracciare la curva media (cfr. appendice 2, fig. 1), altrimenti tracciare una curva per ciascuna bottiglia. Determinare il valore medio della percentuale di biodegradazione nella fase di plateau oppure valutarne il valore massimo (ad esempio, quando la curva scende nella fase di plateau), ma, in quest'ultimo caso, è importante verificare che non sia un valore anomalo (*outlier*). Questo livello massimo di biodegradazione va indicato nella relazione sulla prova come «grado di biodegradazione della sostanza in esame». Se il numero delle bottiglie di prova si è rivelato insufficiente ad indicare una fase di plateau, calcolare un valore medio utilizzando i dati misurati dell'ultimo giorno della prova. Quest'ultimo valore, la media di cinque repliche, serve a indicare la precisione con cui è stata determinata la percentuale di biodegradazione. Nella relazione deve anche figurare il valore ottenuto alla fine della fase di crescita di 10 giorni.

63. Tracciare, allo stesso modo, una curva per la sostanza chimica di riferimento F_C e, eventualmente, per la verifica della degradazione abiotica F_S e per il controllo dell'inibizione F_I.

64. Registrare la quantità di TIC sia dei controlli in bianco (F_B) sia delle bottiglie F_S (verifica abiotica), se queste ultime sono incluse nella prova.

65. Calcolare D per le bottiglie F_I in base al rendimento teorico di carbonio inorganico previsto unicamente in base al componente di riferimento della miscela. Se al 28° giorno $[(D_{FC}\,(^1) - D_{FI}\,(^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, si può presumere che la sostanza in esame abbia inibito l'attività dell'inoculo, il che può spiegare i bassi valori di D_{FT} ottenuti alle condizioni della prova. In tal caso, la prova può essere ripetuta con una concentrazione sperimentale inferiore e riducendo di preferenza il DIC nell'inoculo e il TIC formato nei controlli in bianco, dal momento che una diminuzione della concentrazione della sostanza in esame comporta anche una minore precisione del metodo. In alternativa si può utilizzare un altro inoculo. Se nella bottiglia F_S (degradazione abiotica) si osserva un aumento significativo (> 10 %) della quantità di TIC, è possibile che siano avvenuti processi di degradazione abiotica.

Validità dei risultati

▼M7

66. La prova è considerata valida se:

a) la percentuale media di degradazione nei recipienti F_C contenenti la sostanza chimica di riferimento è >60 % al 14° giorno di incubazione;

b) la quantità media di TIC nei controlli in bianco F_B alla fine della prova è < 3mg C/l.

Se questi valori limite non sono raggiunti, occorre ripetere la prova con un inoculo di provenienza diversa e/o rivedere i procedimenti seguiti. Ad esempio, se nel bianco si registra una produzione elevata di carbonio inorganico, è opportuno seguire il procedimento di cui ai paragrafi da 27 a 32.

(1) La percentuale di degradazione nelle bottiglie F_C contenenti la sostanza di riferimento.
(2) La percentuale di degradazione nelle bottiglie F_I

▼M4

67. Se la sostanza chimica in esame non produce il 60 % di ThIC e ha dimostrato di non esercitare alcun effetto inibitore (paragrafo 65), la prova può essere ripetuta aumentando la concentrazione di inoculo (fino a 30 mg/l di fango attivo e 100 ml di effluente/l), oppure con inoculi di altra provenienza, in particolare se la degradazione è stata di un valore compreso tra 20 % e 60 %.

Interpretazione dei risultati

68. Se la sostanza chimica in esame subisce una biodegradazione > 60 % della ThIC nella fase di crescita di 10 giorni nella presente prova significa che è prontamente biodegradabile in condizioni aerobiche.

69. Se il valore-soglia di 60 % della ThIC non è raggiunto, misurare il pH del mezzo contenuto nelle bottiglie che non sono state acidificate o alcalinizzate; un valore inferiore a 6,5 potrebbe indicare un'avvenuta nitrificazione. In tal caso, ripetere la prova con una soluzione tampone più concentrata.

Relazione sulla prova

70. Disegnare un grafico della percentuale di degradazione (% D) rilevata in ogni bottiglia di prova (F_T), di riferimento (F_C) e, se prevista, di verifica dell'inibizione (F_I) per ciascun giorno di campionamento. Se le repliche danno risultati paragonabili, tracciare la curva della percentuale di degradazione media in funzione del tempo. Annotare la quantità di TIC nei bianchi (F_B) e nei controlli sterili (F_S), come pure il DOC e/o altri parametri, insieme alla loro percentuale di eliminazione.

71. Determinare il valore medio della percentuale di biodegradazione nella fase di plateau, oppure utilizzare il valore massimo se la curva di biodegradazione scende nella fase di plateau, e indicare questo valore come «grado di biodegradazione della sostanza in esame». È importante garantire che, nell'ultimo caso, non si tratti di un valore anomalo (*outlier*).

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

Sostanza chimica in esame:

— nome comune, nome chimico, numero CAS, formula strutturale e proprietà fisico-chimiche pertinenti,

— purezza (presenza di impurità).

Condizioni sperimentali:

— riferimento al presente metodo di prova,

— descrizione del sistema sperimentale utilizzato (ad esempio, volume della bottiglia, rapporto spazio di testa/liquido, metodo di agitazione ecc.),

— applicazione della sostanza in esame e della sostanza di riferimento nel sistema sperimentale; concentrazione applicata e quantità di carbonio introdotta in ciascuna bottiglia di prova, nonché l'eventuale uso di solventi,

— ragguagli sull'inoculo utilizzato, sull'eventuale pretrattamento e precondizionamento,

— temperatura di incubazione,

— validazione del principio dell'analisi del carbonio inorganico,

— caratteristiche principali dell'analizzatore di carbonio inorganico (e di ogni altro metodo d'analisi eventualmente impiegato),

— numero di repliche.

Risultati:

— dati grezzi e valori calcolati della biodegradabilità presentati su tabella,

▼M4

— grafico della percentuale di degradazione in funzione del tempo per la sostanza in esame e quella di riferimento, fase di latenza, fase di degradazione, fase di crescita di 10 giorni e inclinazione,

— percentuale di eliminazione nella fase di plateau, all'inizio e alla fine della prova e dopo la fase di crescita di 10 giorni,

— giustificazione in caso dell'eventuale rigetto dei risultati della prova,

— qualsiasi altro elemento inerente alla procedura seguita,

— discussione dei risultati.

BIBLIOGRAFIA

(1) Capitolo C.4 del presente allegato, Determinazione della «pronta» (*ready*) biodegradabilità — Saggio di sviluppo del CO_2 (Metodo C.4-C).

(2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,.Oil Chem Soc. 50: 159-167.

(3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153-1161.

(4) Larson RJ, Hansmann MA and Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195-1210.

(5) ISO 9439 (1990; revised 1999). Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - Carbon dioxide evolution Test (Sturm).

(6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922-929.

(9) Weytjens D, Van Ginneken I and Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801-812.

(10) Ennis DM and Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181-185.

(11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH and Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51-53.

(12) Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233-243.

(13) Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204-211.

(14) Birch RR and Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507-524.

(15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527-1550.

▼**M4**

(16) ISO 14593, (1999) Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels (C02 headspace test).

(17) Battersby NS (1997). The ISO headspace C02 biodegradation test, Chemosphere 34: 1813-1822.

(18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

(19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR and Starkey M (1999). An «inherent» biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219-3235.

(20) Capitolo C.4 del presente allegato, Determinazione della «pronta» (*ready*) biodegradabilità.

(21) OCSE (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.

(22) Capitolo C.11 del presente allegato, Fanghi attivi: saggio di inibizione della respirazione.

(23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319-327.

(24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

(25) ISO 10634 (1996) Water Quality - Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

▼M4

Appendice 1

ABBREVIAZIONI E DEFINIZIONI

IC: carbonio inorganico.

$ThCO_2$: produzione teorica di biossido di carbonio (mg), ossia la quantità di biossido di carbonio prodotto calcolato in base al tenore di carbonio noto o misurato della sostanza in esame quando sia stata completamente mineralizzata; espressa anche come mg di biossido di carbonio sviluppati per mg di sostanza in esame.

DOC: carbonio organico disciolto, ossia il carbonio organico presente in soluzione, che passa attraverso un filtro da 0,45 micrometri o che rimane nel surnatante dopo centrifugazione a ± 4 000 g (40 000 m/s^{-2}) per 15 minuti.

DIC: carbonio organico disciolto.

ThIC: produzione teorica di carbonio inorganico.

TIC: carbonio inorganico totale.

Prontamente biodegradabile: classificazione arbitraria delle sostanze chimiche che hanno superato certe prove specifiche di selezione riguardo alla biodegradabilità ultima; data la rigorosità di queste prove, si suppone che tali composti si degradino biologicamente in modo rapido e completo in ambienti acquosi in condizioni aerobiche.

Fase di crescita di 10 giorni: i 10 giorni che seguono immediatamente il momento in cui la percentuale di degradazione raggiunge il 10 %.

Biodegradabilità intrinseca: classificazione delle sostanze chimiche per le quali vi è una dimostrazione inequivocabile di biodegradazione (primaria o completa) in qualsiasi prova di biodegradabilità.

Biodegradazione aerobica completa: livello di degradazione raggiunto quando la sostanza in esame è completamente utilizzata da microorganismi, con la conseguente produzione di biossido di carbonio, acqua, sali minerali e nuovi costituenti cellulari microbici (biomassa).

Mineralizzazione: completa degradazione di un composto organico in CO_2 e H_2O in condizioni aerobiche, e in CH_4, CO_2 e H_2O in condizioni anaerobiche.

Fase di latenza: periodo che intercorre tra l'inizio della prova e il momento in cui i microrganismi responsabili della degradazione si sono acclimatati e/o adattati e il livello di degradazione della sostanza chimica o della materia organica ha raggiunto un limite rilevabile (per esempio 10 % della biodegradazione teorica massima, o meno, in funzione dell'accuratezza della tecnica di misura).

Fase di degradazione: periodo che intercorre tra la fine della fase di latenza e il momento in cui è raggiunto il 90 % del livello massimo di degradazione.

Fase di plateau: fase in cui è stata raggiunta la degradazione massima e la curva di biodegradazione presenta un andamento orizzontale.

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

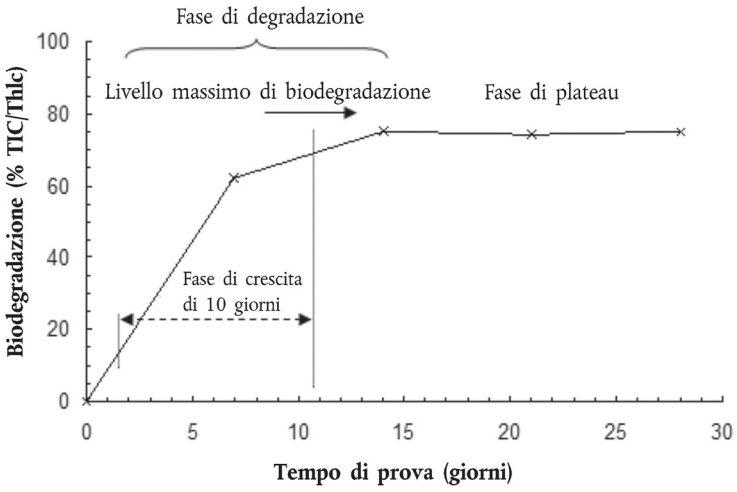
▼M4

Appendice 2

Esempio di curva di biodegradazione

Figura 1

Biodegradazione di 1-ottanolo nella prova del CO_2 nello spazio di testa



Legenda

Biodegradazione

Fase di degradazione

Livello massimo di biodegradazione

Fase di plateau

Fase di crescita di 10 giorni

Tempo di prova (giorni)

▼M4

C.30. BIOACCUMULO NEGLI OLIGOCHETI TERRESTRI

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 317 (2010). Tra i metodi di prova relativi al destino ambientale, quelli intitolati *Bioconcentrazione: saggio sui pesci, metodo a flusso continuo* (capitolo C.13 del presente allegato) (49) e *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates* (53) sono stati pubblicati, rispettivamente, nel 1996 e nel 2008. È difficile, se non impossibile, estrapolare i dati sul bioaccumulo in ambiente acquatico e applicarli a organismi terrestri come i lombrichi. Per valutare il bioaccumulo delle sostanze chimiche nel suolo attualmente si utilizzano modelli calcolati basandosi sulla lipofilia della sostanza in esame (14) e (37), come nel documento tecnico di orientamento dell'UE (19). L'esigenza di un metodo di prova specifico per questo compartimento è già stata sollevata (55), in particolare data l'importanza di poter valutare l'avvelenamento secondario nelle catene alimentari terrestri (4). Esistono vari metodi di prova nazionali che vertono sul bioaccumulo in organismi diversi dai pesci, ad esempio (2) e (72). Un metodo di misurazione del bioaccumulo da suoli contaminati nei lombrichi (*Eisenia fetida*, Savigny) e negli enchitreidi è stato messo a punto dall'American Society for Testing and Materials (3). Un metodo di prova riconosciuto a livello internazionale per la determinazione del bioaccumulo in un suolo addizionato consentirà di valutare meglio i rischi posti dalle sostanze chimiche per gli ecosistemi terrestri, ad esempio (25) e (29).

2. Gli invertebrati detritivori sono esposti alle sostanze chimiche presenti nel suolo. Tra questi animali, gli oligocheti terrestri svolgono un ruolo importante nella struttura e nella funzione del suolo (15) (20). Gli oligocheti terrestri vivono nel suolo e in parte sulla sua superficie (in special modo nella lettiera) e costituiscono spesso la specie più abbondante in termini di biomassa (54). Per la loro azione di bioturbazione e a causa della loro funzione di prede, questi animali possono avere un'influenza determinante sulla biodisponibilità delle sostanze chimiche per altri organismi, come i predatori invertebrati [tra cui acari e coleotteri (64)] e invertebrati (quali volpi e gabbiani) (18) e (62). Alcune specie di oligocheti terrestri attualmente impiegate nelle prove ecotossicologiche sono descritte nell'appendice 5.

3. Una fonte di informazioni essenziali che sono servite per l'elaborazione del presente metodo di prova sul bioaccumulo è il manuale dell'ASTM per le prove di laboratorio dedicate alla tossicità del suolo e al bioaccumulo condotte su lombrichi *Eisenia fetida* ed enchitreidi *Enchytraeus albidus* (3). Tra gli altri riferimenti utilizzati figurano il capitolo C.13 Bioconcentrazione: saggio sui pesci, metodo a flusso continuo (49) e la linea guida dell'OCSE n. 315 *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochate* (53). Fonti di ispirazione altrettanto importanti sono state le esperienze pratiche tratte dagli studi e da diverse pubblicazioni sul bioaccumulo nel suolo, tra cui (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79).

4. Il presente metodo di prova è per lo più applicabile a sostanze chimiche organiche neutre stabili, che hanno tendenza ad essere adsorbite sul suolo. Esso consente anche di valutare il bioaccumulo di composti organometallici stabili, associati al suolo. Si applica inoltre ai metalli e ad altri oligoelementi.

PREREQUISITI

5. Le prove volte a misurare il bioaccumulo di una sostanza chimica negli oligocheti terrestri sono state eseguite con metalli pesanti [cfr. in particolare (63)] e sostanze organiche persistenti il cui log K_{ow} si situa tra 3,0 e 6,0 (40). Queste prove si applicano anche a:

— sostanze chimiche con un log K_{ow} superiore a 6,0 (sostanze superidrofobe),

▼M4

— sostanze appartenenti alla classe di sostanze organiche note per il loro potenziale di bioaccumulo negli organismi viventi, ad esempio le sostanze fortemente adsorbenti o tensioattive,

— sostanze che, per le loro caratteristiche strutturali, presentano un potenziale di bioaccumulo, ad esempio analoghi di sostanze chimiche con potenziale di bioaccumulo noto, e

— metalli.

6. Prima di iniziare lo studio occorre disporre di talune informazioni sulla sostanza chimica in esame, quali nome comune, nome chimico (di preferenza il nome IUPAC), formula strutturale, numero CAS, purezza, precauzioni, condizioni di conservazione adeguate e metodi di analisi. È inoltre opportuno conoscerne le seguenti proprietà:

a) idrosolubilità;

b) coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua K_{ow};

c) coefficiente di ripartizione terreno-acqua, K_{oc};

d) tensione di vapore;

e) degradabilità (nel suolo o nell'acqua);

f) metaboliti noti.

7. È possibile utilizzare sostanze radiomarcate e no, sebbene, per facilitare l'analisi, si raccomanda di utilizzare una sostanza radiomarcata. Questa decisione dipenderà dai limiti di rivelazione o dalla necessità di misurare il composto progenitore e i suoi metaboliti. Se si impiega una sostanza radiomarcata e si misurano i residui radioattivi totali, è importante che i residui radiomarcati sia nel suolo sia negli organismi sperimentali siano caratterizzati in percentuali del composto progenitore e di quello marcato non progenitore, ad esempio in campioni prelevati allo stato stazionario o alla fine della fase di assorbimento, per poter calcolare il fattore di bioaccumulo (BAF) per il composto progenitore e i metaboliti del suolo pertinenti (cfr. paragrafo 50). Può essere necessario modificare il metodo qui descritto, ad esempio per disporre di una biomassa sufficiente a misurare le sostanze in esame organiche non radiomarcate o i metalli. Se si misurano i residui radioattivi totali (per esempio per conteggio in scintillazione liquida dopo estrazione, per combustione o per solubilizzazione dei tessuti), il fattore di bioaccumulo risulta basato sul composto progenitore e sui metaboliti. È preferibile calcolare il BAF in base alla concentrazione del composto progenitore negli organismi e nei residui radioattivi totali. In seguito il fattore di accumulo biota-sedimento (BSAF), normalizzato per il tenore lipidico dei lombrichi e il tenore di carbonio organico (OC), è calcolato a partire dal BAF per garantire la comparabilità dei risultati di diverse prove di bioaccumulo.

8. Occorre conoscere la tossicità della sostanza in esame per le specie utilizzate nella prova, in particolare la concentrazione con effetto (EC_X) o la concentrazione letale (CL_X) per la durata della fase di assorbimento [ad esempio (19)]. La concentrazione scelta per la sostanza in esame deve essere preferibilmente circa l'1 % della sua CL_{50} acuta asintotica e almeno dieci volte superiore del suo limite di rivelabilità nel suolo con il metodo d'analisi utilizzato. Si devono privilegiare, se disponibili, i valori di tossicità ricavati da studi a lungo termine sugli endpoint subletali (51) (52). Se questi dati non sono disponibili, una prova di tossicità acuta apporterà informazioni utili [cfr. ad esempio, (23)].

▼M4

9. Per la quantificazione della sostanza in esame nelle soluzioni di prova, nel suolo e nel materiale biologico, oltre ai dettagli relativi alla preparazione e alla conservazione del campione e alle schede dati sulla sicurezza, è necessario disporre di un metodo analitico appropriato, di accuratezza, precisione e sensibilità note. Devono essere noti anche i limiti di rivelazione analitica nel suolo e nei tessuti del lombrico della sostanza in esame. Quando per la prova si utilizza una sostanza marcata con ^{14}C è necessario conoscere la percentuale di radioattività associata alle impurità. La radioattività specifica della sostanza in esame deve essere abbastanza elevata da facilitare l'analisi, e le concentrazioni sperimentali utilizzate non devono provocare effetti tossici.

10. La prova può essere realizzata con un terreno artificiale o naturale. Prima dell'inizio della prova è opportuno conoscere le caratteristiche del terreno naturale utilizzato, ad esempio l'origine o i componenti, il pH, il tenore di carbonio organico, la distribuzione granulometrica (percentuale di sabbia, limo e argilla), e la capacità idrica (WHC) (3) (48).

PRINCIPIO DEL METODO

11. I parametri che caratterizzano il bioaccumulo di una sostanza chimica in esame consistono nel fattore di bioaccumulo (BAF), la costante di velocità di assorbimento (k_s) e la costante di velocità di eliminazione (k_e). Le definizioni di questi parametri figurano nell'appendice 1.

12. La prova consta di due fasi: la fase di assorbimento (esposizione) e la fase di eliminazione (post-esposizione). Durante la fase di assorbimento varie repliche di gruppi di lombrichi vengono esposte al terreno a cui è stata addizionata la sostanza in esame. Oltre agli animali sperimentali, gruppi di lombrichi di controllo sono mantenuti in condizioni identiche senza la sostanza in esame. Si misura il peso secco e il contenuto di lipidi degli organismi sperimentali, utilizzando eventualmente i lombrichi del gruppo di controllo. I valori di fondo (bianco) possono essere ottenuti analizzando campioni di lombrichi e del terreno di controllo. Per la fase di eliminazione i lombrichi sono trasferiti in un terreno privo della sostanza in esame. A meno che l'assorbimento della sostanza in esame durante la fase di esposizione sia stato insignificante, la fase di eliminazione è sempre necessaria, perché è in questa fase che si raccolgono le informazioni sulla velocità alla quale la sostanza in esame è escreta dagli organismi sperimentali [ad esempio (27)]. Se uno stato stazionario non è stato raggiunto nella fase di assorbimento, è preferibile determinare i parametri cinetici — fattore di bioaccumulo cinetico (BAF_K), costanti di velocità di assorbimento ed eliminazione — basandosi sull'adattamento simultaneo dei risultati delle fasi di assorbimento ed eliminazione. La concentrazione della sostanza in esame nei/sui lombrichi è monitorata per l'intera durata delle due fasi della prova.

13. Durante la fase di assorbimento, le misurazioni sono effettuate in periodi di campionamento la cui durata massima è di 14 giorni per gli enchitreidi e 21 giorni per i lombrichi, fino a quando non venga raggiunto lo stato stazionario (11) (12) (67). Lo stato stazionario è raggiunto quando, nel tracciato della concentrazione negli organismi sperimentali in funzione del tempo, la curva diviene parallela all'asse del tempo e da tre analisi successive della concentrazione su campioni prelevati a intervalli di almeno due giorni si ottengono valori che non divergono tra loro più del ± 20 % sulla base di raffronti statistici (ad esempio, analisi della varianza, analisi di regressione).

14. La fase di eliminazione consiste nel trasferire gli organismi sperimentali in recipienti che contengono lo stesso substrato ma senza la sostanza in esame. In questa fase le misurazioni sono effettuate in periodi di campionamento la cui durata massima è di 14 giorni per gli enchitreidi e 21 giorni per i lombrichi, a meno che un'analisi effettuata prima di questi termini non mostri una diminuzione del 90 % dei residui della sostanza in esame negli organismi sperimentali. La concentrazione della sostanza in esame negli organismi alla fine della fase di eliminazione è riportata nella relazione come residui non eliminati. Il fattore di bioaccumulo allo stato stazionario (BAF_{SS}) è calcolato di preferenza sia come il rapporto tra la concentrazione

▼M4

negli organismi (Ca) e nel suolo (Cs) ad uno stato stazionario apparente, sia come fattore di bioaccumulo cinetico (BAF_K), ossia come il rapporto tra la costante di velocità d'assorbimento dal suolo (ks) e la costante di velocità di eliminazione (ke) (cfr. definizioni nell'appendice 1) presupponendo una cinetica di primo ordine (cfr. calcoli nell'appendice 2). Se la cinetica di primo ordine non è manifestamente applicabile è opportuno ricorrere ad altri modelli.

15. La costante di velocità di assorbimento, la costante di velocità di eliminazione (o le costanti, se si utilizzano altri modelli), il fattore di bioaccumulo cinetico (BAF_K) e, se possibile, gli intervalli di confidenza di ciascuno di questi parametri sono calcolati a partire dalle equazioni dei modelli con l'ausilio di programmi informatici (cfr. appendice 2). La bontà di adattamento di un modello può essere desunta dal coefficiente di correlazione, dal coefficiente di determinazione (coefficienti vicini a 1 indicano un buon adattamento), oppure mediante il test chi quadrato. Anche l'entità dell'errore standard o dell'intervallo di confidenza intorno ai parametri stimati può essere indice della bontà di adattamento del modello.

16. Per ridurre la variabilità dei risultati della prova per le sostanze ad elevata lipofilia, i fattori di bioaccumulo devono essere espressi in relazione al contenuto lipidico e al contenuto di carbonio organico [contenuto in kg di carbonio organico (OC) del suolo per contenuto in kg-1 di lipidi degli organismi sperimentali]. Questo approccio si basa sul fatto che per alcune classi di sostanze chimiche esiste una netta relazione tra il potenziale di bioaccumulo e la lipofilia, relazione che è stata stabilita in modo chiaro per i pesci (47), nei quali il contenuto di grassi e il bioaccumulo di queste sostanze sono correlati. Correlazioni analoghe sono state riscontrate negli organismi bentonici, ad esempio (30) (44), e negli oligocheti terrestri, ad esempio (5) (6) (7) (14). Se si dispone di tessuto di lombrico sufficiente, il contenuto lipidico degli animali sperimentali può essere determinato sullo stesso materiale biologico utilizzato per determinare la concentrazione della sostanza in esame, altrimenti questa misurazione può essere fatta sugli animali di controllo.

VALIDITÀ DELLA PROVA

17. Affinché una prova sia valida occorre che siano soddisfatti i seguenti criteri, sia per gli animali sperimentali sia per i controlli:

— alla fine della prova, la mortalità totale durante le fasi di assorbimento e di eliminazione non deve superare il 10 % (lombrichi) o il 20 % (enchitreidi) del numero complessivo degli organismi introdotti nei recipienti,

— per *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*, la perdita di massa media misurata alla fine delle fasi di assorbimento e di eliminazione non deve superare il 20 % del peso iniziale fresco (f.w.) misurato all'inizio di ogni fase.

DESCRIZIONE DEL METODO

Specie sperimentali

18. Per le prove di bioaccumulo sono raccomandate varie specie di oligocheti terrestri. Le specie più utilizzate sono *Eisenia fetida* o *Eisenia andrei* (Lumbricidi), *Enchytraeus albidus, Enchytraeus crypticus* o *Enchytraeus luxuriosus* (Enchitreidi), descritte nell'appendice 5.

▼M4

Apparecchiatura

19. Per tutte le parti dell'apparecchiatura, evitare accuratamente l'uso di materiali soggetti a dissoluzione, assorbimento o lisciviatura e che possano avere un effetto dannoso sugli animali sperimentali. Si possono usare normali recipienti rettangolari o cilindrici di materiale chimicamente inerte e di capacità adeguata al tasso di carico, ossia al numero degli animali sperimentali. Per le apparecchiature destinate ad entrare in contatto con il mezzo di prova si può usare acciaio inossidabile, plastica o vetro. I recipienti devono essere debitamente coperti per evitare la fuga degli animali, assicurando nel contempo un sufficiente apporto d'aria. Per sostanze con elevati coefficienti di adsorbimento come i piretroidi sintetici, può essere necessario il vetro silanizzato. In tal caso le apparecchiature non possono venire riutilizzate. Occorre evitare la fuoriuscita delle sostanze radiomarcate e l'evaporazione delle sostanze volatili. Utilizzare delle trappole (ad esempio bottiglie di lavaggio per gas in vetro) contenenti un assorbente per catturare eventuali residui che possano evaporare dai recipienti di prova.

Terreno

20. Il terreno sperimentale deve essere di una qualità tale da permettere la sopravvivenza e di preferenza la riproduzione degli organismi sperimentali durante i periodi di acclimatazione e di prova senza che essi presentino un aspetto o un comportamento anomali. I lombrichi devono poter infossarsi nel terreno.

21. Per questa prova si raccomanda di utilizzare il terreno artificiale descritto nel metodo di prova C.8 del presente allegato (48). La preparazione del terreno artificiale da utilizzare nelle prove di bioaccumulo e le indicazioni per la sua conservazione figurano nell'appendice 4. Il terreno artificiale asciugato all'aria può essere conservato a temperatura ambiente fino all'utilizzo.

22. È tuttavia possibile impiegare come terreno di prova e/o di coltura anche terreno naturale proveniente da siti non inquinati. I terreni naturali sono caratterizzati almeno per i seguenti parametri: origine (sito di prelievo), pH, tenore di carbonio organico, distribuzione granulometrica (percentuale di sabbia, limo e argilla), capacità massima di ritenzione idrica (WHCmax) e tenore di umidità (3). La ricerca di microinquinanti nel terreno o nei suoi componenti, prima del suo utilizzo, fornisce informazioni utili. Se si impiega terreno naturale prelevato da suoli agricoli, è opportuno che non sia stato trattato con fitofarmaci né con letame di animali trattati per almeno un anno prima del prelievo, né con fertilizzanti organici per almeno sei mesi prima del prelievo (50). Le procedure per la manipolazione dei terreni naturali prima del loro utilizzo nelle prove ecotossicologiche di laboratorio con oligocheti sono descritte nel manuale dell'ASTM (3). Il tempo di conservazione dei terreni naturali in laboratorio deve essere il più breve possibile.

Applicazione della sostanza in esame

23. La sostanza chimica in esame è incorporata nel terreno, tenendo conto delle proprietà fisico-chimiche di detta sostanza. Una sostanza idrosolubile va disciolta completamente in acqua prima di mescolarla al terreno. Per l'aggiunta delle sostanze poco solubili in acqua, la procedura raccomandata consiste nel rivestire con la sostanza in esame uno o più componenti del terreno (artificiale). Ad esempio, si può impregnare la sabbia di quarzo, o una sua porzione, con una soluzione della sostanza in esame in un solvente organico adatto, che si lascia poi lentamente evaporare a secco. La frazione rivestita può così essere mescolata al terreno umido. Questa procedura ha il

▼M4

grande vantaggio di non introdurre alcun solvente nel terreno. Quando si utilizza un terreno naturale, la sostanza in esame può essere aggiunta arricchendo una porzione di terreno asciugato all'aria come descritto in precedenza per il terreno artificiale, oppure mescolandola al terreno umido, con successiva fase di evaporazione se si utilizza un agente solubilizzante. In linea di principio, il contatto del terreno umido con solventi è da evitarsi per quanto possibile. Va tenuto presente quanto segue:

— se si utilizza un solvente diverso dall'acqua, è opportuno che sia miscibile con l'acqua e/o che possa essere eliminato (ad esempio, per evaporazione), lasciando sul terreno solo la sostanza in esame,

— se si utilizza un solvente di controllo, non è necessario alcun controllo negativo. Il solvente di controllo deve contenere la concentrazione massima del solvente aggiunto al terreno e deve provenire dallo stesso lotto utilizzato per preparare la soluzione madre. La tossicità e la volatilità del solvente, nonché la solubilità della sostanza in esame nel solvente prescelto devono costituire i criteri principali per la scelta dell'agente solubilizzante.

24. Per le sostanze poco solubili in acqua e nei solventi organici, è possibile mescolare alla quantità di sostanza in esame, ad esempio utilizzando un mortaio e pestello, da 2,0 a 2,5 g di sabbia di quarzo finemente macinata per ottenere la concentrazione sperimentale voluta. Questa miscela di sabbia di quarzo e sostanza 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. La procedura è ripetuta per ogni concentrazione sperimentale preparando anche un congruo controllo di 2,0-2,5 g di sabbia di quarzo finemente macinata per recipiente di prova.

25. La concentrazione della sostanza in esame nel terreno va determinata dopo la sua addizione al terreno. La distribuzione omogenea della sostanza nel terreno deve essere verificata prima di introdurre gli organismi sperimentali. Il metodo di addizione prescelto e le ragioni di tale scelta devono essere riportati nella relazione (24).

26. Idealmente l'equilibrio tra il terreno e l'acqua interstiziale deve essere stabilito prima dell'introduzione degli organismi; si raccomanda un periodo di quattro giorni a 20 °C. Per molte sostanze chimiche organiche poco idrosolubili, il tempo necessario per raggiungere un vero equilibrio tra le parti adsorbite e dissolte può essere dell'ordine di vari giorni o mesi. Secondo la finalità dello studio, ad esempio se si tratta di simulare delle condizioni ambientali, può essere necessario «invecchiare» più a lungo il terreno addizionato [per i metalli, tre settimane a 20 °C (22)].

Allevamento degli organismi sperimentali

27. È preferibile tenere i lombrichi e gli enchitreidi in allevamento di laboratorio permanente. Indicazioni sui metodi di allevamento in laboratorio di *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*, e delle specie di enchitreidi figurano nell'appendice 5 [cfr. anche (48) (51) (52)].

28. Gli animali usati nelle prove devono essere esenti da malattie, anomalie e parassiti osservabili.

ESECUZIONE DELLA PROVA

29. Gli organismi sperimentali sono esposti alla sostanza in esame durante la fase di assorbimento. La fase di assorbimento dura 14 giorni (enchitreidi) o 21 giorni (lombrichi) salvo dimostrazione che lo stato stazionario è stato raggiunto prima.

▼M4

30. Per la fase di eliminazione, gli animali sono trasferiti in un terreno privo della sostanza in esame. Il primo campione deve essere prelevato da 4 a 24 ore dopo l'inizio della fase di eliminazione. L'appendice 3 contiene qualche esempio di programma di campionamento con fase di assorbimento e fase di eliminazione di 21 giorni ciascuna.

Organismi sperimentali

31. In molte specie di enchitreidi terrestri il peso individuale è molto basso (ad esempio, 5-10 mg di peso umido per individuo per *Enchytraeus albidus* e peso inferiore per *Enchytraeus crypticus* o *Enchytraeus luxuriosus*); per misurare il peso ed eseguire l'analisi chimica può essere necessario riunire gli animali dei recipienti delle repliche (si utilizzeranno tutti gli animali di una replica per ottenere un risultato unico per i tessuti analizzati). Si utilizzano almeno tre repliche, ciascuna contenente venti enchitreidi. Se il limite di rivelabilità della sostanza in esame è alto, può essere necessario aggiungere più animali. Per le specie sperimentali con peso individuale più elevato (*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*) è possibile allestire repliche costituite ciascuna di un solo individuo.

32. I lombrichi impiegati in una prova devono essere di peso simile (*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei* hanno peso individuale compreso tra 250 e 600 mg). Gli enchitreidi (ad esempio, *Enchytraeus albidus*) devono misurare circa 1 cm di lunghezza. Tutti gli animali impiegati nella stessa prova devono avere la stessa origine ed essere adulti con clitello (cfr. appendice 5). Poiché il peso e l'età dell'animale possono influire sui valori del BAF (a causa, per esempio, del variare del contenuto lipidico e/o della presenza di uova), questi parametri vanno accuratamente riportati nella relazione e tenuti in considerazione al momento di interpretare i risultati. È inoltre possibile che nel periodo di esposizione compaiano dei bozzoli, anch'essi con un effetto sui valori del BAF. Si raccomanda di pesare un sotto-campione di organismi sperimentali prima della prova per stimare il peso medio secco e umido.

33. Per contenere al minimo la riduzione della concentrazione della sostanza in esame durante la fase di assorbimento, occorre utilizzare un rapporto elevato terreno/animali: si raccomanda per *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei* una quantità minima di 50 g in peso secco di terreno per lombrico, mentre per gli enchitreidi un minimo di 10-20 g in peso secco di terreno per recipiente. Lo strato di terreno nei recipienti ha uno spessore di 2-3 cm (enchitreidi) o 4-5 cm (lombrichi).

34. Gli animali utilizzati nella prova sono prelevati dal terreno di allevamento (gli enchitreidi con l'ausilio di pinzette da orafo). Gli animali adulti sono trasferiti in terreno sperimentale non trattato affinché si acclimatino, e qui alimentati (cfr. paragrafo 36). Se le condizioni sperimentali sono diverse dalle condizioni di allevamento, una fase di acclimatazione compresa tra 24 e 72 ore dovrebbe essere sufficiente perché gli animali si adattino alle condizioni sperimentali. Una volta acclimatati, i lombrichi sono trasferiti in piastre di vetro (ad esempio, capsula Petri) contenenti acqua pulita per esservi risciacquati, sono poi pesati e infine deposti sul terreno sperimentale. Prima della pesatura, occorre togliere dagli animali l'acqua in eccesso, passandoli delicatamente sul bordo della piastra o tamponandoli con cura con un fazzoletto di carta leggermente inumidito.

35. Occorre osservare e riportare nella relazione il comportamento fossorio. Nelle prove con i lombrichi, gli animali (di controllo e trattati) in genere s'infossano nel terreno nel giro di qualche ora; questo dato va verificato entro 24 ore dall'introduzione degli animali nei recipienti di prova. Se così non fosse (ad esempio più del 10 % di lombrichi non si è infossato per oltre la metà della fase di assorbimento) la causa va ricercata nelle condizioni

▼M4

sperimentali, che potrebbero essere inadeguate, oppure nello stato di salute degli organismi sperimentali, non buono. In tal caso la prova deve essere arrestata e ripetuta. Gli enchitreidi vivono soprattutto nei pori interstiziali del suolo e accade spesso che il loro tegumento sia solo in parte in contatto con il substrato circostante; si presume che l'esposizione degli enchitreidi fossori e non fossori sia equivalente e l'osservazione di enchitreidi non infossati non richiede necessariamente la ripetizione della prova.

Alimentazione

36. L'alimentazione degli animali va prevista quando si utilizza un terreno povero in carbonio organico totale. Se il terreno utilizzato è artificiale si raccomanda il seguente regime settimanale (una somministrazione la settimana): per i lombrichi, 7 mg di sterco secco per g di terreno in peso secco; per gli enchitreidi 2-2,5 mg di fiocchi d'avena macinati per g di terreno in peso secco (11). La prima razione è mescolata al terreno subito prima di introdurvi gli organismi sperimentali. Utilizzare di preferenza lo stesso tipo di cibo impiegato durante l'allevamento (cfr. appendice 5).

Illuminazione e temperatura

37. Le prove sono condotte in base a un fotoperiodo controllato di 16 ore/8 ore (luce/buio), con un'intensità luminosa di preferenza compresa tra 400 e 800 lx nella zona dei recipienti di prova (3), a una temperatura di 20 ± 2 °C.

Concentrazioni della sostanza in esame

38. Si utilizza un'unica concentrazione. I casi in cui è necessario utilizzarne un'altra, o altre, devono essere motivati. Se la tossicità (CE_X) della sostanza in esame è prossima al limite di rivelabilità analitica, si raccomanda di utilizzare sostanze di prova radiomarcate con radioattività specifica elevata. Per i metalli, la concentrazione deve essere superiore alla concentrazione di fondo nei tessuti e nel terreno.

Repliche

39. Per le misurazioni cinetiche (fasi di assorbimento e di eliminazione), il numero minimo di repliche (recipienti) trattate è tre per punto di campionamento. Il numero complessivo di repliche preparate dovrà essere sufficiente a coprire i campionamenti previsti per le fasi di assorbimento e di eliminazione.

40. Per le osservazioni e le misurazioni biologiche (rapporto peso secco/peso umido, tenore lipidico) e per l'analisi delle concentrazioni di fondo negli animali e nel terreno, occorre allestire almeno 12 repliche di controllo negativo (quattro campioni prelevati all'inizio, quattro alla fine della fase di assorbimento e quattro alla fine della fase di eliminazione), se come solvente non è stata utilizzata che acqua. Se per l'applicazione della sostanza in esame si utilizza un agente di solubilizzazione, occorre allestire, oltre alle repliche trattate, delle repliche di controllo con solvente (quattro recipienti campionati all'inizio, quattro alla fine della fase di assorbimento e quattro alla fine della fase di eliminazione) contenenti tutti i componenti tranne la sostanza in esame. In tal caso è possibile allestire anche altre quattro repliche di controllo negativo (senza solvente) per un campionamento facoltativo alla fine della fase di assorbimento. Queste repliche possono essere confrontate biologicamente con quelle di controllo con solvente per ottenere informazioni sull'eventuale influenza del solvente sugli organismi sottoposti alla prova. Si raccomanda di prevedere un numero sufficiente di repliche di riserva (otto recipienti, ad esempio), per gli organismi trattati e per i controlli.

▼M4

Frequenza delle misure della qualità del terreno

41. Il pH e il tasso di umidità del terreno sono misurati all'inizio e alla fine delle fasi di assorbimento e di eliminazione. La temperatura del locale di prova è misurata in continuo. L'umidità del terreno va controllata una volta la settimana pesando i recipienti di prova e confrontandone il peso con il peso rilevato all'inizio della prova. Le perdite di umidità devono essere compensate aggiungendo acqua deionizzata.

Campionamento e analisi degli organismi sperimentali e del terreno

42. Nell'appendice 3 figura un esempio di programma di campionamento per le fasi di assorbimento e di eliminazione delle prove di bioaccumulo su lombrichi e enchitreidi.

43. Un campione di terreno è prelevato dai recipienti di prova per determinare la concentrazione della sostanza in esame prima dell'introduzione degli animali e durante le fasi di assorbimento e di eliminazione. Durante la prova le concentrazioni della sostanza in esame sono determinate negli animali e nel terreno. In linea di principio, si misurano le concentrazioni totali nel terreno, ma si possono misurare anche le concentrazioni nell'acqua interstiziale, nel qual caso, prima dell'inizio della prova, occorre spiegarne la ragione e descrivere i metodi appropriati previsti, riportando poi tali informazioni nella relazione.

44. Gli animali e il terreno sono campionati almeno a sei riprese durante le fasi di assorbimento e di eliminazione. Se la stabilità di una sostanza di prova è dimostrata, il numero di analisi del terreno può essere ridotto. Si raccomanda di analizzare almeno tre repliche all'inizio e alla fine della fase di assorbimento. Se la differenza tra la concentrazione misurata nel terreno alla fine della fase di assorbimento e la concentrazione iniziale è superiore al 30 %, occorre analizzare i campioni di terreno prelevati in altre date.

45. Ad ogni campionamento, togliere dal terreno gli animali della replica (ad esempio, dopo aver sparso il terreno della replica su un contenitore poco profondo e prelevato gli animali con pinzette da orafo), sciacquarli rapidamente con acqua in un piatto di vetro o di acciaio e asciugarli dell'acqua in eccesso (cfr. paragrafo 34). Trasferirli delicatamente in un recipiente tarato e pesarli immediatamente, contenuto intestinale compreso.

46. Lasciare i lombrichi (*Eisenia* sp.) evacuare l'intestino per una notte, ad esempio su carta da filtro inumidita su una capsula Petri incoperchiata (cfr. paragrafo 34), poi pesarli per valutare l'eventuale perdita di biomassa durante la prova (si vedano i criteri di validità al paragrafo 17). La pesatura e l'analisi dei tessuti degli enchitreidi sono effettuate senza evacuazione intestinale, operazione tecnicamente difficile a causa delle piccole dimensioni di questi animali. Una volta determinato il peso finale, sopprimere immediatamente gli animali con il metodo più appropriato (ad esempio, con azoto liquido o congelandoli a una temperatura inferiore a - 18 °C).

47. Durante la fase di eliminazione, questi animali sostituiscono il contenuto intestinale contaminato con terreno pulito. Ciò significa che le misure relative a un campione di animali a intestino pieno (nella fattispecie gli enchitreidi) eseguite subito prima della fase di eliminazione includono il terreno contaminato ivi presente. Per quanto concerne gli oligocheti acquatici, si presume che dopo le prime 4-24 ore della fase di eliminazione, la maggior parte del contenuto intestinale contaminato sia stato sostituito da sedimento pulito [cfr. ad esempio (46)]. Osservazioni analoghe sono state riferite per i lombrichi in studi sull'accumulo di cadmio e zinco radiomarcati (78). Per quanto riguarda gli enchitreidi con contenuto intestinale intatto, la concentrazione di questo primo campione della fase di eliminazione può essere considerata come la concentrazione dei tessuti dopo evacuazione intestinale. Per tenere conto del fatto che la concentrazione della sostanza in esame viene diluita da terreno non contaminato durante la fase di eliminazione, è possibile stimare il peso del contenuto intestinale in base ai rapporti peso umido degli organismi/peso delle ceneri degli organismi oppure peso secco degli organismi/peso delle ceneri degli organismi.

▼M4

48. È preferibile analizzare i campioni di terreno e di animali subito dopo averli prelevati (ossia entro 1-2 giorni), per evitare il degrado o altre perdite, e si raccomanda di calcolare la velocità approssimativa di assorbimento ed eliminazione durante lo svolgimento della prova. Se l'analisi è posticipata, conservare i campioni in modo idoneo, ad esempio surgelandoli ≤ - 18 °C).

49. Controllare che la precisione e la riproducibilità dell'analisi chimica e che il recupero della sostanza in esame dai campioni di terreno e di animali siano soddisfacenti per il metodo in oggetto; riportare nella relazione l'efficacia di estrazione, il limite di rivelabilità (LOD) e il limite di quantificazione. Verificare inoltre che la sostanza in esame non sia rilevabile nei recipienti di controllo in concentrazioni superiori a quella di fondo. Se la concentrazione della sostanza in esame nell'organismo sperimentale, Ca, è > 0 per i controlli, includere questo dato nel calcolo dei parametri cinetici (cfr. appendice 2). Per tutta la 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 in esame sul dispositivo di campionamento).

50. Qualora si operi con sostanze radiomarcate, è possibile analizzare il progenitore e i metaboliti. Informazioni importanti si ricavano dalla quantificazione del composto progenitore e dei metaboliti allo stato stazionario o alla fine della fase di assorbimento. I campioni vanno in tal caso «puliti» in modo da poter quantificare separatamente il composto progenitore. Si raccomanda di identificare gli eventuali metaboliti che rappresentano più del 10 % della radioattività totale del/i campione/i analizzato/i.

51. Annotare e riferire nella relazione il recupero complessivo e il recupero della sostanza in esame negli animali, nel terreno e, se utilizzate, nelle trappole assorbenti che trattengono la sostanza in esame evaporata.

52. È ammesso per gli enchitreidi, perché di dimensioni più piccole dei lombrichi, il raggruppamento di individui prelevati dal recipiente di prova. Se il raggruppamento implica la riduzione del numero di repliche, ciò limita le procedure statistiche che si possono applicare ai dati ricavati dal campionamento. Se sono richieste una potenza ed una procedura statistiche specifiche, includere nella prova un numero adeguato di repliche per tener conto del raggruppamento, della procedura e della potenza desiderati.

53. Si raccomanda che il BAF sia espresso sia come funzione del peso secco totale e, se necessario (ad esempio per sostanze chimiche fortemente idrofobe), come funzione del tenore lipidico. Per determinare il tenore lipidico avvalersi di metodi idonei [alcuni dei metodi esistenti, ad esempio (31) e (58), vanno adeguati a tal fine]. Questi metodi si basano su una tecnica di estrazione con cloroformio/metanolo, ma se si vuole evitare l'uso di solventi clorati, utilizzare una versione modificata del metodo di Bligh e Dyer (9) descritta in (17). Poiché i vari metodi possono non fornire valori identici, è importante precisare il metodo usato. Quando possibile, ossia se si dispone di sufficiente tessuto animale, il tenore lipidico è idealmente analizzato sullo stesso campione o estratto che è servito per l'analisi della sostanza in esame, in quanto i lipidi devono spesso venire rimossi dall'estratto prima di poterlo analizzare per via cromatografica (49). In alternativa è possibile misurare il tenore lipidico sugli animali di controllo e il valore ottenuto può essere utilizzato per normalizzare i valori del BAF. Con quest'ultimo approccio la contaminazione dell'apparecchiatura con la sostanza in esame è più contenuta.

▼M4

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

54. La curva di assorbimento della sostanza in esame si ottiene rappresentando graficamente la sua concentrazione nel/sugli animali durante la fase di assorbimento in funzione del tempo su scale aritmetiche. Quando la curva ha raggiunto un plateau, o stato stazionario (cfr. definizioni nell'appendice 1), calcolare il fattore di bioaccumulo allo stato stazionario (BAF_{SS}) secondo la seguente formula:

$$\frac{C_a \text{ allo stato stazionario o alla fine della fase di assorbimento (media)}}{C_s \text{ allo stato stazionario o alla fine della fase di assorbimento (media)}}$$

C_a = concentrazione della sostanza in esame nell'organismo sperimentale

C_s = concentrazione della sostanza in esame nel terreno

55. Se la curva non raggiunge lo stato stazionario, invece del BAF_{SS} determinare il BAF_K, in base alle costanti di velocità, come indicato di seguito:

— determinare il fattore di accumulo (BAF_K) come rapporto ks/ke,

— calcolare di preferenza simultaneamente le velocità di assorbimento e di eliminazione (cfr. equazione [11] nell'appendice 2),

— la costante di velocità di eliminazione (k_e) è in genere ricavata dalla curva di eliminazione (ossia dal tracciato della concentrazione della sostanza in esame negli animali durante la fase di eliminazione). Calcolare la costante di velocità di assorbimento k_s in funzione di k_e e di un valore di C_a che è derivato dalla curva di assorbimento — per la descrizione di questi metodi cfr. appendice 2. Il metodo preferito per ottenere il BAF_K e le costanti di velocità k_s e k_e consiste nell'uso di metodi di stima parametrica non lineare su computer. Se la curva di eliminazione non obbedisce manifestamente a una cinetica di primo ordine si dovrà ricorrere a modelli più complessi.

Relazione sulla prova

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

Sostanza chimica in esame:

— ogni informazione disponibile sulla tossicità acuta o a lungo termine (ad esempio CE_X, CL_X, NOEC) della sostanza in esame per gli oligocheti terrestri,

— purezza, natura fisica e proprietà fisico-chimiche, ad esempio log K_{ow}, idrosolubilità,

— dati di identificazione chimica; provenienza della sostanza in esame, identità e concentrazione di eventuali solventi utilizzati,

— in caso di utilizzo di una sostanza radiomarcata, posizione esatta degli atomi marcati, radioattività specifica e purezza radiochimica.

Specie sperimentali:

— nome scientifico, ceppo, provenienza, eventuali pretrattamenti, acclimatazione, età, dimensioni ecc.

▼M4

Condizioni sperimentali:

— procedura di prova utilizzata,

— tipo e caratteristiche dell'illuminazione usata e fotoperiodo,

— disegno sperimentale (ad esempio numero e dimensioni dei recipienti, massa del terreno e spessore dello strato di terreno, numero di repliche, numero di animali per replica, numero di concentrazioni di prova, durata delle fasi di assorbimento e di eliminazione, frequenza di campionamento),

— motivazione del materiale scelto per i recipienti di prova,

— metodo di preparazione e applicazione della sostanza di prova, nonché ragioni della scelta di tale metodo,

— concentrazioni nominali nella prova, medie dei valori misurati e loro deviazioni standard nei recipienti di prova, e metodo mediante cui sono stati ottenuti questi valori,

— provenienza dei componenti del terreno artificiale oppure, se si utilizza terreno naturale, provenienza del terreno, descrizione degli eventuali pretrattamenti, risultati dei controlli (sopravvivenza, aumento della biomassa, riproduzione), caratteristiche del terreno (pH, tenore di carbonio organico totale, distribuzione granulometrica, percentuale di sabbia, limo e argilla), WHC_{max}, tenore di umidità all'inizio e alla fine della prova e eventuali altre misurazioni effettuate,

— informazioni particolareggiate sul trattamento dei campioni di terreno e animali, ivi compresi i dettagli su preparazione, conservazione, procedure di addizione, estrazione e procedure analitiche (e loro precisione) per la sostanza in esame negli animali e nel terreno, il tenore lipidico (se misurato) e i metodi di recupero della sostanza in esame.

Risultati:

— mortalità dei controlli e degli organismi trattati in ogni recipiente e eventuali comportamenti anomali osservati (ad esempio, comportamento non fossorio, assenza di riproduzione in una prova di bioaccumulo con enchitreidi),

— rapporto peso secco/peso umido del terreno e degli organismi sperimentali (utile per la normalizzazione),

— peso umido degli animali ad ogni campionamento; per i lombrichi, peso umido all'inizio della prova e ad ogni campionamento prima e dopo l'evacuazione intestinale,

— tenore lipidico degli organismi sperimentali (se determinato),

— curve che mostrano le costanti cinetiche di assorbimento e di eliminazione della sostanza in esame negli animali e il tempo occorso per raggiungere lo stato stazionario,

— C_a e C_s (con deviazione standard e intervallo, se necessario) per ogni campionamento (C_a espressa in g kg^{-1} di peso umido e secco del corpo intero, C_s espressa in g kg^{-1} di peso umido e secco del terreno). Se è necessario ricavare un fattore di accumulo biota-sedimento (BSAF), (ad esempio per confrontare i risultati di due o più prove realizzate su animali con tenore lipidico diverso), C_a può essere espressa anche come g kg^{-1} di tenore lipidico dell'organismo e Cs come g kg^{-1} di carbonio organico (OC) del terreno,

— BAF (espresso in kg terreno kg^{-1} di animale), costante di velocità di assorbimento dal terreno k_s (espressa in g di terreno kg^{-1} di animale $giorno^{-1}$), e costante di velocità di eliminazione k_e (espressa in $giorno^{-1}$); eventualmente anche BSAF (espresso in kg di OC del terreno kg^{-1} di tenore lipidico dell'animale),

▼M4

— se misurate: percentuali del composto progenitore, dei metaboliti e dei residui combinati (ossia la percentuale della sostanza in esame che non può essere estratta con i normali metodi di estrazione) rilevate nel terreno e 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 17,

— risultati imprevisti o insoliti, ad esempio, eliminazione incompleta della sostanza in esame dagli animali sperimentali.

BIBLIOGRAFIA

(1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

(2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

(3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus.* ASTM International, E1676-04: 26 pp.

(4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation - New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93-99.

(6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W & Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154-165.

(7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.

(8) Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus.* Ann. Mus. Novitat. 1902: 1-13.

(9) Bligh EG and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911-917.

(10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 p.

(11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

(12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185-196.

(13) Conder JM and Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida.* J. Soils Sediments 3: 13-20.

▼M4

(14) Connell DW and Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91-100.

(15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2-29.

(16) Didden W (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, pagg. 555-576.

(17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140-145.

(19) 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 (GU L 396 del 30.12.2006, pag. 1).

(20) Edwards CA and Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.

(21) OCSE (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Available for download at: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

(23) Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.

(24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.

(26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897-1905.

(27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501-1514.

(28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼M4

(29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78-84.

(30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225-1231.

(31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099-1105.

(32) Hawker DW and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(33) Hund-Rinke K and Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15-20.

(34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.

(35) ISO 11268-2 (1998) Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.

(36) Jaenike J (1982). «*Eisenia foetida*» is two biological species. Megadrilogica 4: 6-8.

(37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080-2090.

(38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953-961.

(39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767-775.

(40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399-3404.

(41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

(42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217-232.

(43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.

(44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi.* Environ. Sci. Toxicol. 23: 588-595.

(45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17-26.

(46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates.* Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244-1249.

▼**M4**

(47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

(48) Capitolo C.8 del presente allegato, Tossicità per i lombrichi.

(49) Capitolo C.13 del presente allegato, Bioconcentrazione: saggio sui pesci, metodo a flusso continuo.

(50) Capitolo C.21 del presente allegato, Microrganismi del suolo: test di trasformazione dell'azoto.

(51) OCSE (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(52) OCSE (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(53) OCSE (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates., Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(54) Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388.

(55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.

(56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77-81.

(57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida.* RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

(58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431-1436.

(59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

(60) Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 pp.

(61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.

(62) Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W,Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107-127.

(63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110-2120.

(64) Schlosser H-J and Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413-433.

(65) Schmelz R and Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93–100.

▼M4

(66) Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

(67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557–2563.

(68) Spacie A and Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.

(70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta.* Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

(72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(73) Van Brummelen TC and Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

(74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel CA and Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023-1033.

(76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409-417.

(77) Venter JM and Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161-165.

(78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843-1851.

(79) Widianarko B and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402–406.

▼M4

Appendice 1

DEFINIZIONI

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).

Bioconcentrazione: aumento di concentrazione della sostanza in esame in o su un organismo, derivante dall'assorbimento della sostanza esclusivamente dall'ambiente circostante (ossia attraverso la superficie corporea e in terreno ingerito), 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 contaminate, rispetto alla concentrazione della sostanza in esame nell'alimento o nella preda. La biomagnificazione può comportare un trasferimento o un accumulo della sostanza in esame nelle reti trofiche.

Eliminazione della 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.

Fattore di bioaccumulo (BAF) in qualsiasi momento della fase di assorbimento della prova: concentrazione della sostanza in esame in o sull'organismo sperimentale (C_a in $g \cdot kg^{-1}$ di peso secco dell'animale) diviso per la concentrazione della sostanza chimica nell'ambiente circostante (C_s espressa in $g \cdot kg^{-1}$ di peso secco del terreno); il BAF è espresso in kg di terreno$\cdot kg^{-1}$ di animale.

Fattore di bioaccumulo allo stato stazionario (BAF_{SS}): BAF allo stato stazionario, che non varia in modo significativo per un lungo periodo, periodo durante il quale la concentrazione della sostanza in esame nell'ambiente circostante (C_s in $g \cdot kg^{-1}$ di peso secco del terreno) rimane costante.

Fattori di bioaccumulo cinetico (BAF_K): fattori di bioaccumulo calcolati direttamente dal rapporto tra la costante di velocità di assorbimento dal terreno e la costante di velocità di eliminazione (k_s and k_e, cfr. di seguito).

Fattore di accumulo biota-sedimento (BSAF): concentrazione normalizzata per il tenore lipidico della sostanza in esame nel o sull'organismo sperimentale divisa per la concentrazione normalizzata per il tenore di carbonio organico della sostanza in esame nel terreno allo stato stazionario. C_a è pertanto espressa in $g \cdot kg^{-1}$ di tenore in lipidi dell'organismo, e C_s in $g \cdot kg^{-1}$ di tenore in carbonio organico del terreno; il BSAF è espresso in kg di carbonio organico kg^{-1} di lipidi.

Plateau o **stato stazionario**: equilibrio tra il processo di assorbimento e di eliminazione che si verificano simultaneamente nella fase di esposizione. Lo stato stazionario, nel tracciato del BAF 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 il controllo di sostanze che vengono assorbite lentamente, intervalli di sette giorni saranno più idonei (49).

Coefficiente di ripartizione carbone organico-acqua (K_{oc}): rapporto tra la concentrazione di una sostanza chimica nella o sulla frazione di carbonio organico di un terreno e la concentrazione della sostanza all'equilibrio.

Coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (K_{ow}): rapporto tra la solubilità di una 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 indicazione del potenziale di bioaccumulo di una sostanza chimica da parte di organismi acquatici.

▼M4

Fase di assorbimento o esposizione: tempo durante il quale gli organismi sperimentali sono esposti alla sostanza chimica in esame.

Costante di velocità di assorbimento dal terreno (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 terreno. k_s è espressa in g di terreno kg^{-1} di animale $giorno^{-1}$.

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 dall'organismo sperimentale.

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 $giorno^{-1}$.

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

▼M4

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 nell'organismo sperimentale, C_a, per la concentrazione del terreno C_s, allo stato stazionario. Se lo stato stazionario non è raggiunto durante la fase di assorbimento, il BAF_K è calcolato a partire dalle costanti di velocità invece che dal BAF_{SS}. Va tuttavia annotato se il BAF si basa o meno sulle concentrazioni allo stato stazionario.

La procedura abituale per ottenere il fattore di bioaccumulo cinetico (BAF_K), la costante di velocità di assorbimento dal terreno (k_s) e la costante di velocità di eliminazione (k_e) consiste nel ricorrere a metodi informatici non lineari di stima dei parametri, ad esempio sulla base dei modelli descritti in (68). Data una serie di valori sequenziali della concentrazione in funzione del tempo e le equazioni dei modelli

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{equazione [1]}$$

oppure

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{equazione [2]}$$

dove:

C_a = concentrazione della sostanza negli animali [$g \cdot kg^{-1}$ di peso umido o secco]

k_s = costante di velocità di assorbimento nei tessuti [g di terreno kg^{-1} di animale $giorno^{-1}$]

C_a = concentrazione della sostanza nel terreno [$g \cdot kg^{-1}$ di peso umido o secco]

k_e = costante di velocità di eliminazione [$giorno^{-1}$]

t_c = tempo al termine della fase di assorbimento,

questi programmi informatici calcolano i valori di BAF_K, k_s e k_e.

Quando la concentrazione di fondo negli animali non esposti, ad esempio il giorno 0, è significativamente diversa da zero (come può essere il caso dei metalli), tale concentrazione ($C_{a,0}$) deve essere inclusa in queste equazioni, come segue:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{equazione [3]}$$

e

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{equazione [4]}$$

Se si osserva un forte calo della concentrazione della sostanza di prova nel terreno durante la fase di assorbimento, è possibile utilizzare i seguenti modelli, ad esempio (67) e (79):

$$C_s = C_0(e^{-k}0^{t}) \qquad \text{equazione [5]}$$

▼M4

dove:

C_s = concentrazione della sostanza nel terreno [g·kg^{-1} di peso umido o secco]

k_0 = costante di velocità di degradazione nel terreno [d-1]

C_0 = concentrazione iniziale della sostanza nel terreno [g·kg^{-1} di peso umido o secco]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{equazione [6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{equazione [7]}$$

dove:

C_a = concentrazione della sostanza negli animali [g·kg^{-1} di peso umido o secco]

k_s = costante di velocità di assorbimento nei tessuti [g di terreno·kg^{-1} di animale giorno^{-1}]

k_0 = costante di velocità di degradazione nel terreno [giorno^{-1}]

k_e = costante di velocità di eliminazione [giorno^{-1}]

t_c = tempo al termine della fase di assorbimento.

Quando si è raggiunto uno stato stazionario durante la fase di assorbimento (ossia $t = \infty$), è possibile ridurre l'equazione

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{equazione [1]}$$

all'equazione:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

oppure

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{equazione [8]}$$

In seguito $k_s/k_e \times C_s$ dà un'approssimazione della concentrazione della sostanza in esame nel tessuto dell'animale allo stato stazionario ($C_{a,ss}$).

Il fattore di accumulo biota-sedimento (BSAF) può essere calcolato come segue:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{equazione [9]}$$

dove f_{oc} è la frazione di carbonio organico nel terreno e f_{lip} è la frazione di lipidi negli animali, entrambe determinate di preferenza su campioni prelevati dalla prova, e basate rispettivamente sul peso secco o sul peso umido.

Per modellizzare le costanti cinetiche di eliminazione si possono utilizzare i dati ricavati dalla fase di eliminazione e applicare la seguente equazione del modello e un metodo informatico non lineare di stima dei parametri. 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 compartimento singolo (equazione [9]).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{equazione [10]}$$

▼**M4**

I processi di eliminazione paiono talvolta 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, ad esempio (27) e (68). Le due fasi possono essere interpretate ipotizzando l'esistenza di due compartimenti 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 (38) (39) (40) e (78).

Le equazioni del modello illustrate sopra possono servire a calcolare simultaneamente i parametri cinetici (k_s and k_e), applicando un modello di cinetica di primo ordine a tutti i dati delle fasi di assorbimento e di eliminazione simultaneamente. Per una descrizione di un metodo che permetta un tale calcolo combinato delle costanti di velocità di assorbimento ed eliminazione, consultare ad esempio (41), (73) e (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{equazione [11]}$$

NB: quando i parametri di assorbimento e di eliminazione sono stimati simultaneamente sulla base dei dati combinati di assorbimento ed eliminazione, «m» di cui all'equazione [11] è un descrittore che consente al programma informatico di attribuire i sottotermini dell'equazione alle serie di dati della fase corrispondente e eseguire una valutazione corretta (m = 1 per la fase di assorbimento; m = 2 per la fase di eliminazione).

Ciononostante, queste equazioni di modelli vanno utilizzate con cautela, in particolare se nella prova si verificano cambiamenti della biodisponibilità o della (bio)degradazione della sostanza in esame [cfr. ad esempio (79)].

▼M4

Appendice 3

ESEMPI DI PROGRAMMI PER LE PROVE DI BIOACCUMULO NEL TERRENO

Prova sui lombrichi

a) Fase di assorbimento con 8 date di campionamento per il calcolo dei parametri cinetici

Giorno	Attività
- 6	Condizionamento del terreno preparato per 48 ore.
- 4	Addizione della soluzione della sostanza in esame alla frazione di terreno; evaporazione degli eventuali solventi; miscelazione dei componenti del terreno; distribuzione del terreno nei recipienti di prova; equilibrazione alle condizioni sperimentali per 4 giorni (3 settimane per i terreni addizionati di metalli).
da - 3 a - 1	Rimozione degli organismi sperimentali dal terreno di allevamento per acclimatazione; preparazione e umidificazione dei componenti del terreno.
0	Misurazione della temperatura e del pH del terreno; prelievo di campioni di terreno dai recipienti trattati e dai controlli con solvente per la determinazione della concentrazione della sostanza in esame; introduzione di una razione di cibo; pesatura e distribuzione casuale degli animali nei recipienti di prova; accantonamento di un numero sufficiente di sottocampioni di animali per determinare i valori analitici di fondo, del peso umido e secco e del tenore lipidico; pesatura di tutti i recipienti di prova per il controllo dell'umidità del terreno; controllo del flusso d'aria, se si utilizza un sistema sperimentale chiuso.
1	Controllo del flusso d'aria, annotazione del comportamento degli animali e della temperatura; prelievo di campioni di terreno e di animali per determinare la concentrazione della sostanza in esame.
2	Idem come il 1° giorno.
3	Controllo del flusso d'aria, del comportamento degli animali e della temperatura.
4	Idem come il 1° giorno.
5 - 6	Idem come il 3° giorno.
7	Idem come il 1° giorno; introduzione di una razione di cibo; controllo dell'umidità del terreno ripesando i recipienti e compensando l'acqua evaporata.
8 - 9	Idem come il 3° giorno.
10	Idem come il 1° giorno.
11 - 13	Idem come il 3° giorno.
14	Idem come il 1° giorno; introduzione di una razione di cibo; controllo dell'umidità del terreno ripesando i recipienti e compensando l'acqua evaporata.
15 - 16	Idem come il 3° giorno.
17	Idem come il 1° giorno.
18 - 20	Idem come il 3° giorno.

▼**M4**

Giorno	Attività
21	Idem come il 1° giorno; misurazione della temperatura e del pH del terreno; controllo dell'umidità del terreno ripesando i recipienti; fine della fase di assorbimento; trasferimento degli animali dalle restanti repliche esposte ai recipienti contenenti terreno pulito per la fase di eliminazione (senza evacuazione dell'intestino); prelievo di campioni di terreno e animali dai controlli con solvente.
	Le attività che precedono l'esposizione (fase di equilibrazione) sono programmate tenendo conto delle proprietà della sostanza chimica in esame.
	Le attività descritte per il 3° giorno sono effettuate quotidianamente (almeno nei giorni lavorativi).

b) Fase di eliminazione

Giorno	Attività
- 6	Preparazione e umidificazione dei componenti del terreno; condizionamento del terreno preparato per 48 ore.
- 4	Miscelazione dei componenti del terreno; distribuzione del terreno nei recipienti di prova; incubazione alle condizioni sperimentali per 4 giorni.
0 (fine della fase di assorbimento)	Misurazione della temperatura e del pH del terreno; pesatura e distribuzione casuale degli animali nei recipienti di prova; introduzione di una razione di cibo; trasferimento degli animali dalle restanti repliche esposte ai recipienti contenenti terreno pulito; prelievo di campioni di terreno e di animali dopo 4-6 ore per determinare la concentrazione della sostanza in esame.
1	Controllo del flusso d'aria, annotazione del comportamento degli animali e della temperatura. prelievo di campioni di terreno e di animali per determinare la concentrazione della sostanza in esame.
2	Idem come il 1° giorno.
3	Controllo del flusso d'aria, del comportamento degli animali e della temperatura.
4	Idem come il 1° giorno.
5 - 6	Idem come il 3° giorno.
7	Idem come il 1° giorno. introduzione di una razione di cibo; controllo dell'umidità del terreno ripesando i recipienti e compensando l'acqua evaporata.
8 - 9	Idem come il 3° giorno.
10	Idem come il 1° giorno.
11 - 13	Idem come il 3° giorno.
14	Idem come il 1° giorno. introduzione di una razione di cibo; controllo dell'umidità del terreno ripesando i recipienti e compensando l'acqua evaporata.
15 - 16	Idem come il 3° giorno.
17	Idem come il 1° giorno.

▼M4

Giorno	Attività
18 - 20	Idem come il 3° giorno.
21	Idem come il 1° giorno. misurazione della temperatura e del pH del terreno; controllo dell'umidità del terreno ripesando i recipienti; prelievo di campioni di terreno e animali dai controlli con solvente.
	La preparazione del terreno per la fase di eliminazione è eseguita come per la fase di assorbimento.
	Le attività descritte per il 3° giorno sono effettuate quotidianamente (almeno nei giorni lavorativi).

Prova sugli enchitreidi

a) Fase di assorbimento con 8 date di campionamento per il calcolo dei parametri cinetici

Giorno	Attività
- 6	Condizionamento del terreno preparato per 48 ore.
- 4	Addizione della soluzione della sostanza in esame alla frazione di terreno; evaporazione degli eventuali solventi; miscelazione dei componenti del terreno; distribuzione del terreno nei recipienti di prova; equilibrazione alle condizioni sperimentali per 4 giorni (3 settimane per i terreni addizionati di metalli).
da - 3 a - 1	Rimozione degli organismi sperimentali dal terreno di allevamento per acclimatazione; preparazione e umidificazione dei componenti del terreno.
0	Misurazione della temperatura e del pH del terreno; prelievo di campioni di terreno dai recipienti trattati e dai controlli con solvente per la determinazione della concentrazione della sostanza in esame; introduzione di una razione di cibo; pesatura e distribuzione casuale degli animali nei recipienti di prova; 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; pesatura di tutti i recipienti di prova il controllo dell'umidità del terreno; controllo del flusso d'aria, se si utilizza un sistema sperimentale chiuso.
1	Controllo del flusso d'aria, annotazione del comportamento degli animali e della temperatura; prelievo di campioni di terreno e di animali per determinare la concentrazione della sostanza in esame.
2	Idem come il 1° giorno.
3	Controllo del flusso d'aria, del comportamento degli animali e della temperatura.
4	Idem come il 1° giorno.
5 - 6	Idem come il 3° giorno.
7	Idem come il 1° giorno; introduzione di una razione di cibo; controllo dell'umidità del terreno ripesando i recipienti e compensando l'acqua evaporata.
9	Idem come il 1° giorno.
10	Idem come il 3° giorno.

▼**M4**

Giorno	Attività
11	Idem come il 1° giorno.
12 - 13	Idem come il 3° giorno.
14	Idem come il 1° giorno; introduzione di una razione di cibo; misurazione della temperatura e del pH del terreno; controllo dell'umidità del terreno ripesando i recipienti; fine della fase di assorbimento; trasferimento degli animali dalle restanti repliche esposte ai recipienti contenenti terreno pulito per la fase di eliminazione (senza evacuazione dell'intestino); prelievo di campioni di terreno e animali dai controlli con solvente.
	Le attività che precedono l'esposizione (fase di equilibrazione) sono programmate tenendo conto delle proprietà della sostanza chimica in esame.
	Le attività descritte per il 3° giorno sono effettuate quotidianamente (almeno nei giorni lavorativi).

▼M4

Appendice 4

Terreno artificiale — indicazioni per la preparazione e la conservazione

Poiché, nel corso dell'anno, non sempre si può disporre di terreno naturale di una determinata origine e dato che gli organismi indigeni e i microinquinanti in esso presenti possono influire sull'esito della prova, si raccomanda di utilizzare in questa prova il terreno artificiale di cui al capitolo C.8 del presente allegato, Tossicità per i lombrichi (48). Si tratta di un terreno in cui possono sopravvivere, crescere e riprodursi varie specie sperimentali e che offre sia una standardizzazione massima sia la comparabilità intra e interlaboratorio delle condizioni di prova e di allevamento.

Componenti

Torba	10 %	Torba di sfagno in conformità con la linea guida OCSE n. 207 (48)
Sabbia di quarzo	70 %	Sabbia di quarzo industriale (asciugata all'aria); granulometria: > 50 % delle particelle comprese tra 50 e 200 μm, ma tutte ≤ 2 mm
Argilla caolinica	20 %	Tenore di caolinite ≥ 30 %
Carbonato di calcio	≤ 1 %	$CaCO_3$, in polvere, chimicamente puro

Il tenore di carbonio organico del terreno artificiale può anche essere ridotto, diminuendo, ad esempio, la percentuale di torba al 4-5 % di terreno secco e aumentando proporzionalmente il contenuto di sabbia. Con un tenore inferiore di carbonio organico, può risultare inferiore l'adsorbimento della sostanza in esame nel terreno (carbonio organico) e aumentare la disponibilità della sostanza in esame per gli animali (74). È stato dimostrato che *Enchytraeus albidus* e *Eisenia fetida* possono soddisfare i criteri di validità relativi alla riproduzione quando saggiati in terreni naturali con un tenore più basso di carbonio organico, ad esempio 2,7 % (33) e (61), ed è stato sperimentalmente constatato che ciò vale anche con un terreno artificiale contenente 5 % di torba.

Preparazione

Mescolare accuratamente i componenti secchi del terreno (ad esempio in un grande miscelatore da laboratorio), operazione che può essere eseguita circa una settimana prima dell'inizio della prova. Inumidire la miscela con acqua deionizzata almeno 48 ore prima di applicarvi la sostanza in esame per equilibrare/stabilizzare l'acidità. Per determinare il pH, utilizzare una miscela di terreno con una soluzione di 1 M KCl in rapporto 1:5. Se il pH non rientra nell'intervallo richiesto (6,0 ± 0,5), aggiungere al terreno $CaCO_3$ in quantità sufficiente oppure preparare un nuovo lotto di terreno.

Determinare la capacità massima di ritenzione idrica (WHC_{max}) del terreno artificiale in base alla norma ISO 11268-2 (35). Almeno due giorni prima dell'inizio della prova, inumidire il terreno aggiungendo acqua deionizzata o acqua artificiale in quantità sufficiente a ottenere circa la metà del tenore d'umidità finale. Il tenore di umidità finale deve rappresentare dal 40 % al 60 % della WHC_{max}. Suddividere, all'inizio della prova, il terreno preinumidito in un numero di lotti pari al numero delle concentrazioni sperimentali e dei controlli da utilizzarsi nella prova, e aggiustare il tenore di umidità al 40 – 60 % della WHC_{max} aggiungendo la soluzione della sostanza in esame e/o acqua deionizzata o artificiale. Misurare il tenore di umidità all'inizio e alla fine della prova (a 105 °C) per accertarsi che soddisfi in modo ottimale le esigenze delle specie sperimentali (ad esempio, se stringendo leggermente in mano un pugno di terreno, tra le dita compaiono delle goccioline d'acqua).

▼M4

Conservazione

Conservare i componenti secchi del terreno artificiale a temperatura ambiente fino al momento dell'uso. Conservare il terreno preparato e preinumidito in luogo fresco per tre giorni al massimo prima di addizionarvi la sostanza in esame, avendo cura di ridurre al minimo l'evaporazione d'acqua. Una volta addizionata la sostanza in esame, utilizzare il terreno immediatamente, salvo vi siano informazioni che indicano la possibilità di conservarlo senza alterare la tossicità e la biodisponibilità della sostanza di prova. Conservare fino all'analisi i campioni di terreno addizionato alle condizioni raccomandate per la sostanza in esame.

▼M4

Appendice 5

Specie di oligocheti terrestri raccomandate per le prove di bioaccumulo nel suolo

Lombrichi

La specie raccomandata per questa prova è *Eisenia fetida* (Savigny 1826) della famiglia dei Lumbricidi. Dal 1972, la si suddivide in due sottospecie [*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei* (10)]. Secondo Jaenike (36), si tratta di due specie a sé stanti. *Eisenia fetida* è facilmente riconoscibile per le strisce giallo acceso intersegmentarie, mentre *Eisenia andrei* ha una livrea uniforme color rosso scuro. Probabilmente originarie della regione del Mar Nero, sono oggi diffuse in tutto il mondo, soprattutto in habitat modificati dalle attività antropiche, come i mucchi di compost. Entrambe si prestano ad essere utilizzate nelle prove ecotossicologiche e di bioaccumulo.

Eisenia fetida e *Eisenia andrei* sono disponibili in commercio, ad esempio come esche per la pesca. Rispetto ad altri lumbricidi, hanno un ciclo di vita breve e raggiungono la maturità in 2-3 mesi (a temperatura ambiente). Prosperano a temperature oscillanti tra i 20 e i 24 °C e prediligono substrati relativamente umidi, con pH pressoché neutro e a forte tenore di materia organica. Dato che si tratta di specie ampiamente utilizzate da 25 anni in prove ecotossicologiche standardizzate, il loro allevamento è ormai diffuso (48) (77).

Entrambe le specie possono essere allevate in deiezioni animali di vario tipo. Il mezzo di allevamento raccomandato dall'ISO (35) è una miscela di letame di equini o bovini e torba in parti uguali. Il mezzo deve avere un pH di circa 6-7 (aggiustato con carbonato di calcio), una conduttività ionica bassa (minore di 6 mS/cm o concentrazione di sali inferiore a 0,5 %) e non essere troppo contaminato da ammoniaca o urina animale. Si può utilizzare anche la terra da giardino che si trova in commercio, priva di additivi, oppure terreno artificiale quale definito dall'OCSE (48), o ancora una miscela di entrambi in parti uguali. Il substrato dovrebbe essere umido ma non troppo bagnato. Le cassette d'allevamento più idonee hanno capacità compresa tra 10 e 50 litri.

Per ottenere una popolazione di lombrichi omogenea per età e massa, è consigliabile iniziare l'allevamento con i bozzoli. A tal fine introdurre una quantità di animali adulti in una cassetta d'allevamento contenente substrato fresco. L'esperienza dimostra che si ottengono buoni tassi di riproduzione con una densità demografica di circa 100 lombrichi adulti per kg di substrato (peso umido). Dopo 28 giorni togliere i lombrichi adulti. I lombrichi nati dai bozzoli sono utilizzati per le prove una volta adulti, ossia dopo almeno 2 mesi dalla schiusa ma non oltre 12 mesi.

Si può ritenere che i lombrichi delle specie qui descritte godano di buona salute se si muovono nel substrato, non tentano di fuggire e si riproducono continuamente. Una certa inazione o una colorazione gialla dell'estremità posteriore (nel caso di *Eisenia fetida*) sono indici di impoverimento del substrato. In tal caso si raccomanda di utilizzare substrato fresco e/o ridurre il numero di animali per cassetta.

Bibliografia scelta di approfondimento

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.

▼M4

Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1-171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331-338 pp.

Enchitreidi

La specie consigliata per questa prova è *Enchytraeus albidus* (Henle 1837 — verme bianco). *Enchytraeus albidus* è una delle specie di maggiori dimensioni (fino a 15 mm) della famiglia di anellidi oligocheti degli Enchitreidi ed è diffusa in tutto il mondo (8). La si ritrova in ambiente marino, dulciacquicolo e terrestre, principalmente nella materia organica in putrefazione (alghe, compost), talvolta nei terreni prativi (42). L'ampia valenza ecologica che caratterizza questa specie e alcune sue variazioni morfologiche indicano che potrebbero esistere varie razze.

Enchytraeus albidus è reperibile in commercio, sotto forma di mangime per pesci. Occorre verificare se l'allevamento è contaminato da altre specie, generalmente più piccole (60), nel qual caso gli animali vanno lavati con acqua in una capsula Petri. Per avviare un nuovo allevamento, scegliere gli esemplari adulti di grandi dimensioni (prelevandoli con un microscopio stereoscopico) e scartare tutti gli altri. Il ciclo di vita di questo animale è breve, dato che raggiunge la maturità in un tempo oscillante tra 33 (a 18 °C) e 74 giorni (a 12 °C). Utilizzare per questa prova solo gli animali che siano stati tenuti in laboratorio almeno 5 settimane (una generazione) e che non abbiano mostrato complicazioni.

Anche altre specie del genere *Enchytraeus* sono adatte per questa prova, in particolare *Enchytraeus luxuriosus.* Questa specie è prevalentemente terricola, come è stato recentemente descritto in (65). Se si impiegano altre specie di *Enchytraeus* occorre identificarle in modo chiaro e giustificare tale scelta nella relazione.

La specie *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992) appartiene allo stesso gruppo di *Enchytraeus luxuriosus*. Poiché questa specie è stata descritta solo negli allevamenti di lombrichi e nei mucchi di compost (Römbke 2003), la sua esistenza in natura non è certa e quindi non se ne conoscono le esigenze ecologiche. Pur tuttavia, alcuni studi recenti di laboratorio condotti su vari tipi di terreno hanno confermato la grande tolleranza di questa specie verso caratteristiche del suolo quali ph e struttura (Jänsch *et al.* 2005). Negli ultimi anni essa è stata spesso utilizzata negli studi ecotossicologici proprio perché semplice da allevare e da saggiare (Kuperman *et al.* 2003). Presenta tuttavia l'inconveniente delle piccole dimensioni, che, essendo in media da 3 a 12 mm (Westheide & Müller 1996), ne rendono difficoltosa la manipolazione rispetto a *Enchytraeus albidus*. Quando si utilizza questa specie invece di *Enchytraeus albidus*, i recipienti di prova possono essere più piccoli, ma non necessariamente. Va inoltre tenuto in considerazione che questa specie si riproduce molto rapidamente, con un tempo di moltiplicazione inferiore a 20 giorni a 20 ± 2 °C (Achazi *et al.* 1999) se non ancor più basso a temperature più elevate.

Gli enchitreidi della specie *Enchytraeus albidus* (così come di altre specie di enchitreidi) possono essere allevati in grandi cassette di plastica (di dimensioni, ad esempio, 30 × 60 × 10 cm oppure, per vermi piccoli, 20 × 12 × 8 cm) riempite di una miscela di terreno artificiale e terra da giardino reperibile in commercio, non contaminata e priva di additivi. Il compost è da evitare poiché può contenere sostanze tossiche, come i metalli pesanti. Prima dell'utilizzo, eliminare la fauna indigena dal terreno di allevamento surgelandolo tre volte. È possibile utilizzare un terreno completamente artificiale, tenendo presente che il tasso di riproduzione potrebbe essere più lento rispetto a quello che si osserva con i substrati misti. Il substrato deve avere un pH di 6,0 ± 0,5. Tenere gli animali al buio, in un'incubatrice con temperatura di 15 ± 2 °C, evitando in ogni caso temperature superiori a 23 °C. Il terreno artificiale o naturale deve essere umido, ma non bagnato, tale che, se premuto leggermente con la mano, lasci filtrare in superficie solo qualche gocciolina d'acqua. Evitare di creare condizioni anossiche (se si utilizza un coperchio, accertarsi che abbia un numero di fori sufficienti a garantire un congruo ricambio d'aria). Il terreno va aerato rimescolandolo delicatamente una volta la settimana.

▼M4

Alimentare gli animali almeno a cadenza settimanale, a volontà, con fiocchi d'avena posti in una cavità sulla superficie del terreno e ricoperti di terra. Se rimane cibo dalla volta precedente, adeguare la nuova razione in funzione della quantità rimasta. Se il cibo restante presenta muffa, sostituirlo con una nuova razione di fiocchi d'avena. Per stimolare la riproduzione, i fiocchi d'avena possono essere sostituiti, ogni due settimane, da una polvere proteica, reperibile in commercio, arricchita di vitamine. Dopo tre mesi trasferire gli animali in un substrato di allevamento fresco. Conservare i fiocchi d'avena in recipienti ermeticamente chiusi e sterilizzarli in autoclave o riscaldarli prima di somministrarli, onde prevenire eventuali infestazioni da acari della farina (ad esempio *Glycyphagus sp.*, Astigmata, Acarina) o da acari predatori [ad esempio *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina]. Una volta disinfettato, macinare l'alimento in modo da poterlo distribuire con facilità sulla superficie del terreno. In alternativa ai fiocchi d'avena si può utilizzare lievito per panificazione o mangime per pesci TetraMin®.

In linea di principio, le condizioni di allevamento sono soddisfacenti se gli animali non cercano di scappare dal substrato, si spostano rapidamente su di esso, presentano una livrea brillante, di colore bianco più o meno intenso, sulla quale le particelle di terreno non aderiscono e sono rappresentati da varie fasce d'età. Di fatto, si può ritenere che gli animali godano di buona salute se si riproducono continuamente.

Bibliografia scelta di approfondimento

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51-83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651-656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607-616.

Westheide W and Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.

Westheide W and Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263-267.

▼M6

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 ECx o un tasso di applicazione efficace ERx (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,

▼M6

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 colturali 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

▼M6

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 colturali 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.

▼M6

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

▼M6

della prova. La densità massima deve essere di circa 3-10 semi per 100 cm^2, 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 colturali 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 stabilita 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

▼M6

(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_x o ER_x 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

▼M6

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 EC_{25}, ER_{25}, EC_{50}, ER_{50}) 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 R^2 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:

▼M6

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;

▼M6

— 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 EC_{50}, ER_{50}, EC_{25}, ER_{25}) 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.

▼M6

(9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., and Zwerger, P. (1997). Effects of Plant Protection Products on Non-Target Organisms — A contribution to the Discussion of Risk Assessment and Risk Mitigation for Terrestrial Non-Target Organisms (Flora and Fauna). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. No 48.

(10) Hale, B., Hall, J.C., Solomon, K., and Stephenson, G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario Canada.

(11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(12) Audus, L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. In: Audus, L.J. ed. The Physiology and biochemistry of Herbicides, London, New York, Academic Press, NY, Chapter 5, pp. 163-206.

(13) Beall, M.L., Jr. and Nash, R.G. (1969). Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61:571-575.

(14) Beetsman, G.D., Kenney, D.R. and Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247-250.

(15) U.S. Food and Drug Administration (FDA). (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 pp., FDA, Washington, DC.

(16) McKelvey, R.A., Wright, J.P., Honegger, J.L. and Warren, L.W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science vol. 58:1161-1174

(17) Boutin, C.; Elmegaard, N. and Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology vol. 13(4): 349-369.

(18) Boutin, C., and Rogers, C.A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides — An analysis with two databases. Ecotoxicology vol. 9(4):255-271.

(19) Boutin, C. and Harper, J.L. (1991). A comparative study of the population dynamics of five species of Veronica in natural habitats. J. Ecol. 9:155-271.

(20) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T.E., Batchelor, S.P. and Maguire, R.J. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532-2541.

(21) OECD (2006). 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).

▼M6

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 EC_{25}/ER_{25} o EC_{50}/ER_{50}).

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.

▼**M6**

Appendice 2

Elenco di specie storicamente utilizzate nelle prove sulle piante

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

▼**M6**

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

▼M6

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 sementi [7]	Altri riferimenti [8]
APIACEAE *Torilis japónica* (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 *Bellis perennis* (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
Centaurea cyanus (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
Centaurea nigra (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	
Inula helenium (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	

▼M6

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)
Leontodon hispidus (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)		
Rudbeckia hirta (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	
Solidago canadensis (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	
Xanthium pensylvanicum (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	
Xanthium spinosum (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	
Xanthium strumarium (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	
BRASSICACEAE *Cardamine pratensis* (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	

▼M6

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]
CARYOPHYLLACEAE *Lychnis flos-cuculi* (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 *Chenopodium album* (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 *Hypericum perforatum* (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 *Ipomoea hederacea* (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 *Cyperus rotundus* (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
FABACEAE *Lotus corniculatus* (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	

▼M6

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]
Senna obtusifolia (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	
Sesbania exaltata (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	
Trifolium pratense (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 *Leonurus cardiaca* (cardiaca)	P spazi aperti (16)	0,75-1,0 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		nessun trattamento speciale (4, 14)	POST (4)	F	
Mentha spicata (menta verde)	P zone umide (16)	2,21 (4)		0 (4)		nessun trattamento speciale (4)	POST (4)	F	
Nepeta cataria (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	

▼M6

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)
Prunella vulgaris (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	
Stachys officinalis (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 *Abutilón theophrasti* (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	
Sida spinosa (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 *Papaver rhoeas* (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	
POACEAE *Agrostis tenuis* (agrostide volgare)	prato, pastura (16)	0,07 (14)	L > D (IO)	20 (10)	10 (62 %) (10)	germinazione inibita dall'oscurità (1, 17-19), nessun trattamento speciale (10)	POST (10)	A, E	
Alopecurus myosuroides (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 KNO3 (14) stratificazione a caldo (1) germinazione inibita dall'oscurità (1) nessun trattamento speciale (34)	PRE & POST (28, 34)	A	32

02008R0440 — IT — 08.01.2026 — 011.001 — 1186

▼M6

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)
Avena fatua (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	
Bromus tectorum (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	
Cynosurus cristatus (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	
Digitaria sanguinalis (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 KNO3 (14) germinazione inibita dall'oscurità (1) nessun trattamento speciale (21)	PRE & POST (18, 25, 31)	A	
Echinochloa crusgalli (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	
Elymus canadensis (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	
Festuca pratensis (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

▼M6

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]
Hordeum pusillum (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
Phieum pratense (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	
POLYGONACEAE *Polygonum convolvulus* (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
Polygonum lapathifolium (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	
Polygonum pennsylvanicum (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	
Polygonum persicaria (poligono persicaria, persicaria maculosa)	A zone perturbate, seminativi (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

▼M6

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)
Rumex crispus (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
PRIMULACEAE *Anagallis arvensis* (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 *Ranunculus acris* (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 *Geum urbanum* (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 *Galium aparine* (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

▼M6

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)
Galium mollugo (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 *Digitalis purpurea* (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	
Veronica persica (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 sementi commerciali.
(8) Fornisce due riferimenti alternativi consultati.

▼M6

Fornitori di sementi 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., Elmegaard, N., & Kjaer, C. 2004. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment. Ecotoxicology, 13:349-369.

(5) Breeze, V., Thomas, G., & Butler, R. 1992. Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. Annals of Applied Biology, 121:669-677.

(6) Brown, R.A., & Farmer, D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. In: Plants for toxicity assessment: 2nd volume. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang e M.A. Lewis, eds. American Society for Testing & Materials, Philadelphia. pagg. 197-208.

▼**M6**

(7) Buhler, D.D. & Hoffman, M.L. 1999. Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants. Weed Science Society of America, Lawrence, K.

(8) Clapham, A.R., Tutin, T.G., & Warburg, E.F. 1981. Excursion flora of the British Isles, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge

(9) Clay, P.A. & Griffin, J.L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. Weed Science, 48:481-486.

(10) Cole, J.F.H. & Canning, L. 1993. Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. BCPC — Weeds. 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.rbgkew.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.

▼**M6**

(26) Marrs, R.H. & Frost, A.J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. Journal of Environmental Management, 50:369-388.

(27) Marshall, E.J.P. & Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. BCPC — Weeds. 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.

▼**M6**

Appendice 4

Esempi di condizioni colturali 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 $\mu E/m^2/s$, 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*).

▼M6

C.32. **PROVA DI RIPRODUZIONE SU ENCHITREIDI**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 3 della parte 0.

▼**M6**

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

▼**M9**

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 3 della parte 0.

▼M6

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 inibitrici, 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

▼M6

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 EC_{50} 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.

▼M6

RIPRODUCIBILITÀ DEI RISULTATI

10. In una prova interlaboratorio internazionale (5) è stata rilevata solo una media riproducibilità tra i valori di EC_{50} 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 EC_{50} 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 EC_{50} 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 EC_{50} per il 3,5-diclorofenolo, i coefficienti di variazione erano nettamente inferiori (22, 9 e 18 %, rispettivamente, per il valore EC_{50} 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;

([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.

▼M6

c) manometro di precisione [1] 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 sfiatare 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 sfiatare 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;

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 5μl/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

[1] 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).

▼M6

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 mm^2 (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 si 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 tetracloruro 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)).

▼M6

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 EC_{50} 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.

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).

([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.

▼M6

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).

▼M6

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 deossigenata (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 °C ± 2 °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 °C ± 2 °C, misurare e registrare il pH del contenuto di due delle quattro bottiglie allestite all'uopo, 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.

▼M6

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 EC_{50} (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 EC_{50} 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 EC_{50}. 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;

▼M6

— 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 contenti 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 EC_{50}, 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.

▼M6

(6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. Wat. Pollut. Control, 70, 58-70.

(7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, In: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.

(8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Env. Microbiol. 47 850-857.

(9) Battersby NS and Wilson V (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. Chemosphere 17, 2441-2460.

(10) Wilson V, Painter HA and Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods, GSF Forschungzentrum, 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.

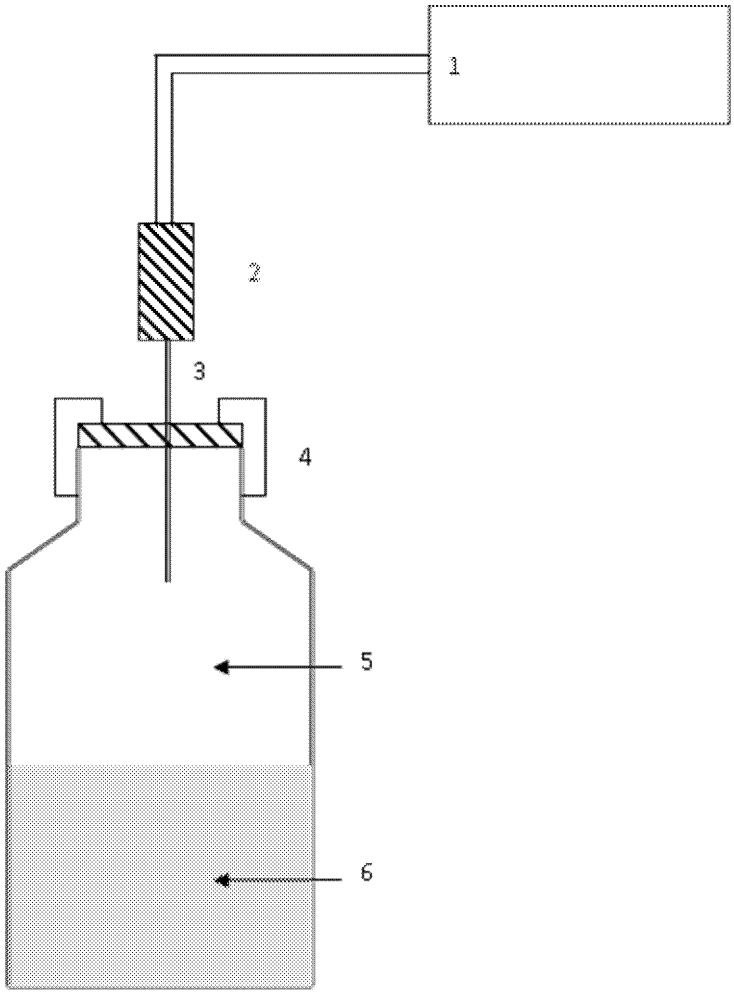
(12) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(13) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

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 °C ± 2 °C

▼M6

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 °C ± 2 °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 °C ± 2 °C in cinque bottiglie da siero. Sigillare le bottiglie e posarle in un bagnomaria a 35 °C ± 2 °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 °C ± 2 °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 richiuderla;

— 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.

▼**M6**

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 EC_{50} 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).

▼M6

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 sperimentali 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:

a) eseguire una prova preliminare modificata (paragrafo 25) con un campione non diluito di fanghiglia, suolo ecc. a 35 °C ± 2 °C o alla temperatura del luogo di raccolta del campione, per ottimizzare la simulazione (come nella parte 1 della norma ISO 13 641);

b) 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 °C ± 2 °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 (~30-35 °C), mesofili (20-25 °C) e psicrofili (< 20 °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.

▼**M6**

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 ± 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 ± 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)	

▼**M6**

cloruro di calcio diidrato ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,75 g
cloruro di magnesio esaidrato ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	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) esaidrato ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	1,0 g
cloruro di nichel (II) esaidrato ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	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 ± 5 % a ± 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 ± 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.

▼**M6**

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'iniezione 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 diluzione 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	—

▼**M6**

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.

▼M6

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 acquatici. 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 benthos. 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. EC_{50}, EC_{25} ed EC_{10}), 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

▼M6

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

▼M6

(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 (KC1) 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 disciolto, 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

▼M6

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 lisciviatura 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 *Lumbriculus 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 $CaCO_3$/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 $CaCO_3$ 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).

▼M6

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 essiccata 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 ($CaCO_3$) 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 quando 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

▼M6

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 criterio 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 *Lumbriculus* 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

▼M6

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.

▼M6

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. EC_{50} EC_{25}, EC_{10}) 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

▼M6

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 °C ± 2 °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 ± 1 °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 disciolto non scenda al di 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;

▼M6

Tenore di ossigeno disciolto:	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 attaccheranno 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 orologiaio (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

▼M6

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:

a) non vi è alcuna reazione dopo un leggero stimolo meccanico;

b) vi sono segni di decomposizione (in combinazione con la lettera a));

c) manca un certo numero di vermi.

Inoltre, i vermi in vita possono essere attribuiti a uno dei tre gruppi:

a) vermi completi di dimensioni grandi (adulti) senza regioni corporee rigenerate;

b) 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);

c) 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 contati/esaminati, 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 essiccamento 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 situi al di fuori dell'intervallo di ± 20 % della concentrazione nominale). In caso di specifiche proprietà chimiche, ad esempio se si prevede una rapida degradazione

▼M6

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 ± 600 × *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 °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.

▼M6

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 ± 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 ($\overline{X}$) 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 Cohran, 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 Dunnett 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-Whithey. Alcune informazioni sulla potenza statistica riscontrata durante la verifica di ipotesi nella prova interlaboratorio del metodo figurano nell'appendice 6.

▼M6

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;

▼**M6**

— 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 disciolto, 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.

▼**M6**

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(6) 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. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

(11) Riedhammer C. & B. Schwarz-Schulz (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105-110.

(12) ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.

(13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 202 67 429.

(14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(15) Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; fifth draft, March 2003; Report EPS 1/RM/___

(16) Nikkilä A., Halme A., Kukkonen J.V.K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35-46.

(17) Baily H.C., & Liu D.H.W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. p. 205-215. In J.C. Eaton, P.R. Parrish, and A.C. Hendricks (eds). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.

▼**M6**

(18) Chapman K. K., Benton M. J., Brinkhurst R. O. & Scheuerman P. R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. Environmental Toxicology. 14(2): 271-278.

(19) Meyer J.S., Boese C.J. & Collyard S.A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. Comp. Biochem. Physiol. Part C 133:99-109.

(20) Schubauer-Berigan M.K., Dierkes J.R., Monson P.D. & Ankley G.T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. Environ. 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-17α-ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. Chemosphere 59, 271-280.

(31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007.

(32) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

▼**M6**

(33) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). Environ. 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., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

(45) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.

(46) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(47) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. 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.

▼M6

(50) OECD 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OECD, Paris, France.

(51) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Germany. pp. 107-119.

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.

▼M6

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 saggiata 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 saggiata seguendo il presente metodo di prova.

▼**M6**

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 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ in acqua deionizzata; portare a 1 l con acqua deionizzata.

(b) *Soluzione di solfato di magnesio*

Dissolvere 4,93 g di $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ in acqua deionizzata; portare a 1 l con acqua deionizzata.

(c) *Soluzione di carbonato di sodio*

Dissolvere 2,59 g di $MgSO_3 \times 7$ H2O 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 μScm^{-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».

▼**M6**

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.

▼M6

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», essiccata all'aria, priva di residui visibili di piante, finemente macinata (dimensioni delle particelle ≤ 0,5 mm)	5 ± 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 (Folia urticae), foglie di Urtica dioica, finemente macinate (dimensione delle particelle ≤ 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 ± 0,5
Carbonato di calcio	$CaCO_3$, in polvere, chimicamente puro, in aggiunta al sedimento secco	0,05 - 1
Acqua deionizzata	Conduttività ≤ 10 µS/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 ≤ 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 ± 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± 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

▼M6

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.

▼M6

Appendice 5

Metodi di allevamento per il *Lombricus 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/cm^2 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 asessuata 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.

▼M6

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 — Ecotossicologia
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Germania

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finlandia

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 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

▼**M6**

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.

▼M6

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**			

▼M6

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**			

▼M6

Tabella 3

Tossicità del PCP: sintesi degli endpoint della prova interlaboratorio; medie interlaboratorio per EC_{50}, 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	**EC_{50}**	**23,0**	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	**9,9**	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	**27,9**	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	DMR (%)	**22,5**	7,1	39,1				
Peso secco totale dei vermi	**EC_{50}**	**20,4**	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	**9,3**	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	**25,7**	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	DMR (%)	**24,8**	10,9	44,7				
Mortalità/sopravvivenza	**LC_{50}**	**25,3**	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOEC	**16,5**	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	**39,1**	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
Riproduzione (aumento del numero di vermi per replica)	**EC_{50}**	**20,0**	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	**7,9**	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	**22,5**	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	DMR (%)	**29,7**	13,9	47,9				
Crescita (aumento della biomassa per replica)	**EC_{50}**	**15,3**	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	**8,7**	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	**24,0**	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	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.

▼M6

C.36. **PROVA DI INIBIZIONE DEL TASSO RIPRODUTTIVO DI UN ACARO PREDATORE (*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*) IN CAMPIONI DI SUOLO**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 3 della parte 0.

▼M6

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 secernere la vitellogenina in risposta ad una stimolazione estrogenica esogena.

▼**M6**

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 17β-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 omogenati 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

▼M6

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 disciolto 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 ± 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 fornice le necessarie indicazioni dettagliate.

(f) bilancia sufficientemente precisa (precisione di ± 0,5 mg).

▼M6

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 ±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^{-}, and 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 100µl/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:

▼M6

— 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.

▼M6

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 ± 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. II 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 ± 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.

▼M6

34. Durante la prova, l'ossigeno disciolto, 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).

▼M6

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 zebrato 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 zebrato 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 duplicato). 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

▼M6

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;

▼M6

— 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 disciolto, 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 disciolto;

— 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;

▼M6

— 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/1 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 µg/l) con una conseguente diminuzione della VTG nelle femmine e una sostanza usata per i controlli positivi dell'attività androgenica (17β -trenbolone a 5 µg/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.

▼**M6**

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 *endpoint*s of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

(12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

▼**M6**

(13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (Pimephales promelas) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

(14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (Danio rerio Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

(15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131

(16) Rose J, Holbech H, Lindholst C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17ß-estradiol and 17ß-ethinylestradiol in male zebrafish (Danio rerio). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531-539.

(17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

(18) Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang IJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (Oryzias latipes). Jpn J Environ Toxicol 4:87–98.

(19) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50:301-308.

(20) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

(21) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (Oryzias latipes). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

(22) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris

(23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

(24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as «signposts,» not «traffic lights,» in risk assessment. Environmental Health Perspectives; 114 Suppl 1:106-14.

(25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (Pimephales promelas). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

▼**M6**

(26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve and G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

(27) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54. ENV/JM/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

▼**M6**

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 LC_{50}.

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

▼M6

Appendice 2

Condizioni sperimentali per lo screening del sistema endocrino dei pesci

1. Specie raccomandata	**Ciprinide** (*Pimephales promelas*)	**Medaka** (*Oryzias latipes*)	**Danio zebrato** (*Danio rerio*)
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

▼M6

18. Aerazione	Nessuna aerazione tranne se la concentrazione dell'ossigeno disciolto scende al di sotto del 60 % della salutazione dell'aria	Nessuna aerazione tranne se la concentrazione dell'ossigeno disciolto scende al di sotto del 60 % della salutazione dell'aria	Nessuna aerazione tranne se la concentrazione dell'ossigeno disciolto 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 disciolto >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 disciolto >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 disciolto >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.

▼**M6**

Appendice 3

Alcune caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione accettabile

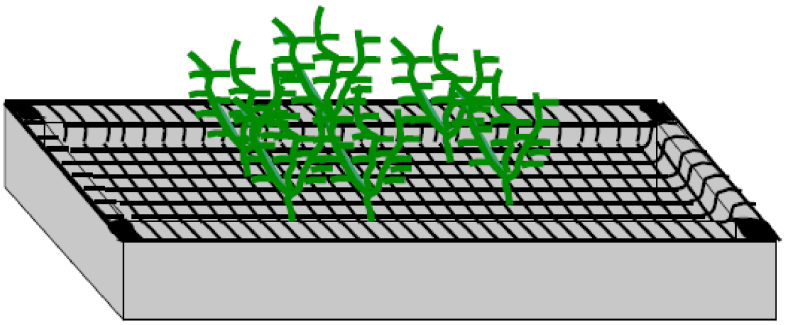
Componente	Concentrazioni
Particolato	< 20mg/l
Carbonio organico totale	< 2mg/l
Ammoniaca non ionizzata	< 1µg/l
Cloro residuo	< 10µg/l
Pesticidi organofosforati totali	< 50ng/l
Pesticidi organoclorurati totali più difenili policlorurati	< 50ng/l
Cloro organico totale	< 25 ng/l

▼M6

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.

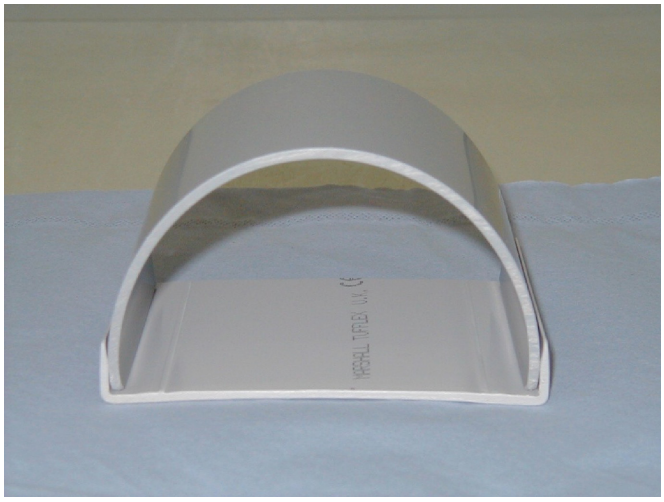
▼**M6**

Appendice 4B

Substrato di riproduzione per la specie *Pimephales promelas*

Due o tre piastre 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 lisciviati 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

▼M6

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 17β -metiltestosterone o il 17β -trenbolone possono provocare l'insorgere di tubercoli nuziali nelle femmine di *Pimephales promelas* (ciprinidi) femmina (Smith, 1974; Ankley *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.

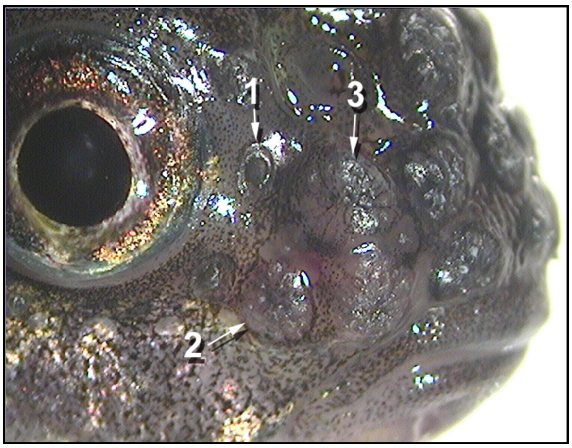
▼M6

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.

▼M6

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**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**

▼M6

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 pterigioforo).

(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.

▼**M6**

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 registrarne 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 conservarlo.

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].

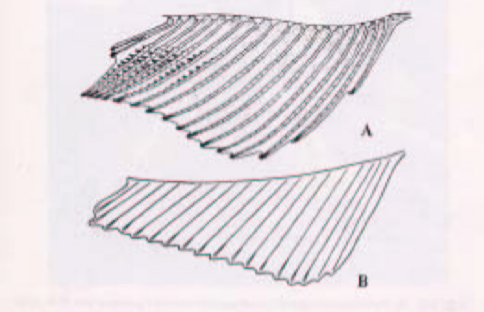
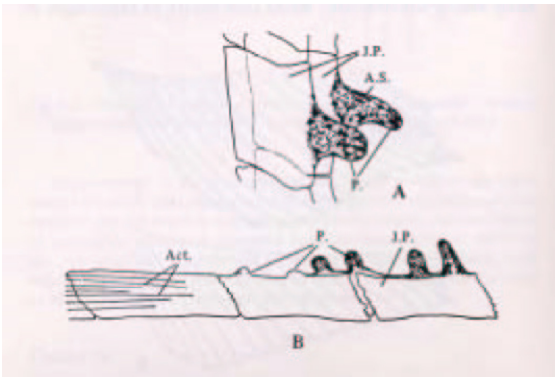


Figura 2

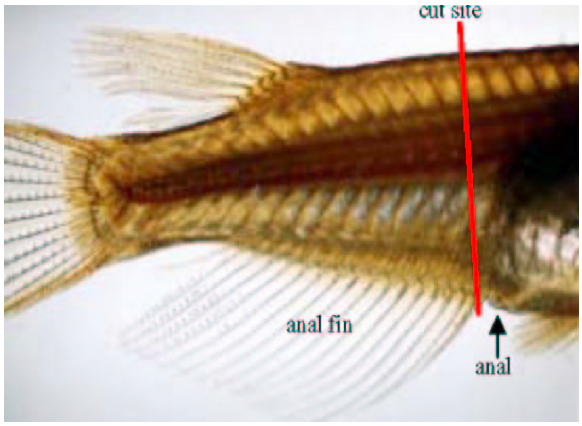
A: Processi che avvengono sui segmenti congiunti del raggio della pinna anale. J.P., (*joint plate*): segmento congiunto; A.S.: spazio assiale; P:, processo. B: estremità distale della pinna anale. Gli attinotrichi (Act.) si trovano sulle punte. [Oka, T. B., (1931). Sui processi che avvengono sui raggi della pinna dell'esemplare maschio di *Oryzias latipes* e altri caratteri sessuali del pesce, cfr. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218].



▼M6

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 %.



▼M6

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 -800C fino all'analisi (Panter *et al.*, 1998).

Procedura 2A: Escissione del fegato in *Oryzias latipes* (medaka)

Rimozione dei pesci oggetti 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.

▼**M6**

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.

▼M6

(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 ≤ -70 °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.

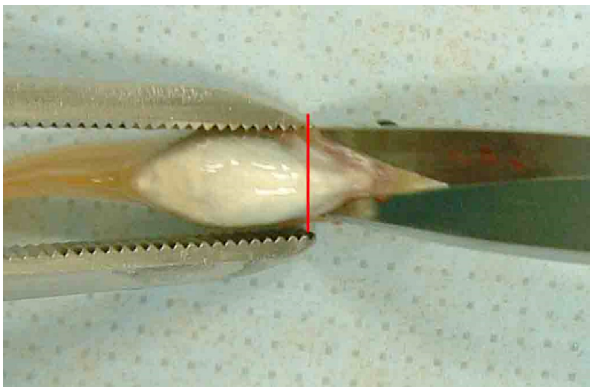
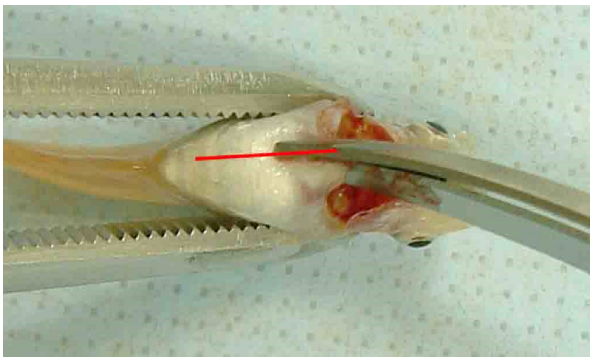


Figura 2

Tagliare la linea mediana dell'addome con forbici da un punto situato a circa 2 mm dal cranio fino all'ano.



▼M6

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

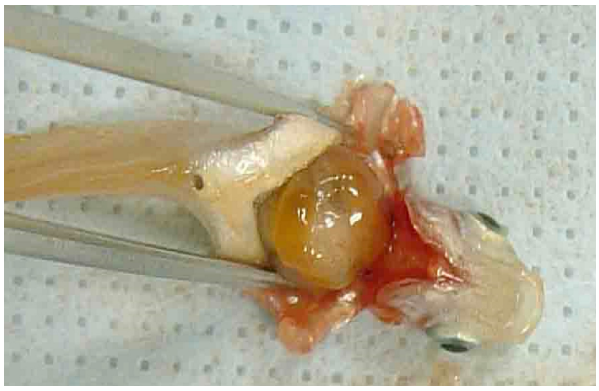


Figura 4

Il fegato è dissezionato e rimosso mediante le pinzette.

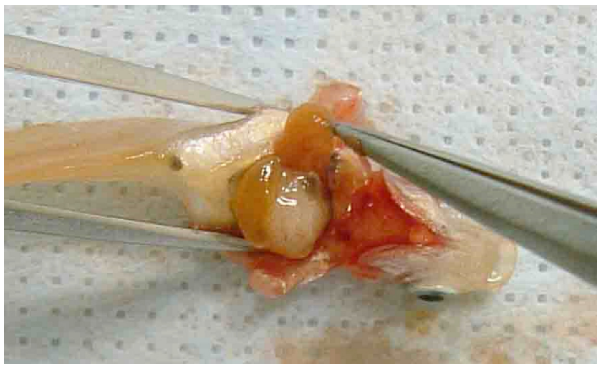


Figura 5

Gli intestini sono rimossi delicatamente con le pinzette.



▼M6

Figura 6

Le due estremità degli intestini e gli attacchi del mesenterio sono separati con le forbici.

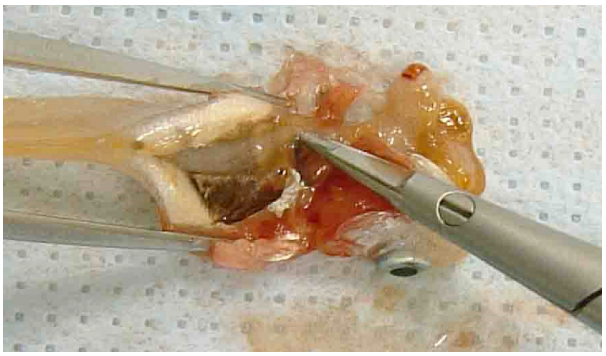


Figura 7 (femmina)

La procedura è identica per le femmine.

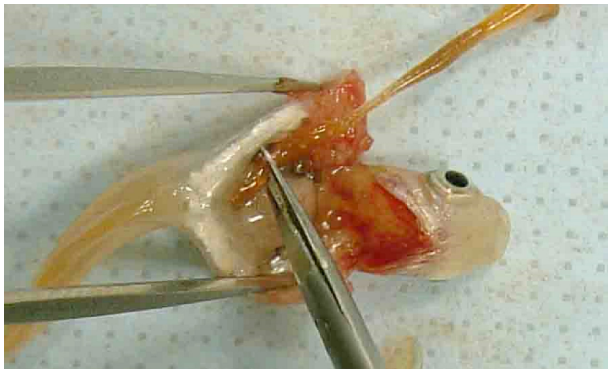
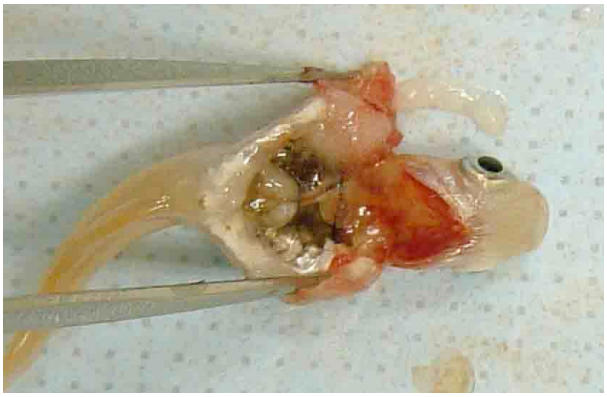


Figura 8

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: ≤ 4 °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.

▼**M6**

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.

▼**M6**

(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 ≤ 5 °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 ≤ 5 °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: ≥ 100 µl). 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.

▼M6

(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 ≤ -70 °C fino all'esecuzione dell'analisi ELISA.

Procedura 3A: Prelievo di campioni ematici dall'arteria/ vena caudale nel danio zebrato

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 zebrato

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 zebrato. 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 zebrato

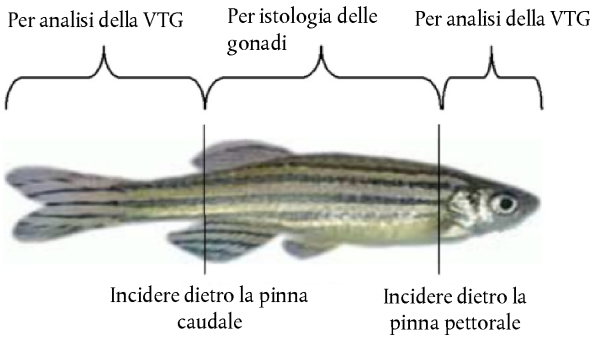
(1) I pesci sono anestetizzati e soppressi in modo incruento come da protocollare sperimentale.

(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.

▼**M6**

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.

▼**M6**

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 proverrà da un lotto diverso da quello utilizzato per preparare gli standard di calibrazione per la prova in corso.

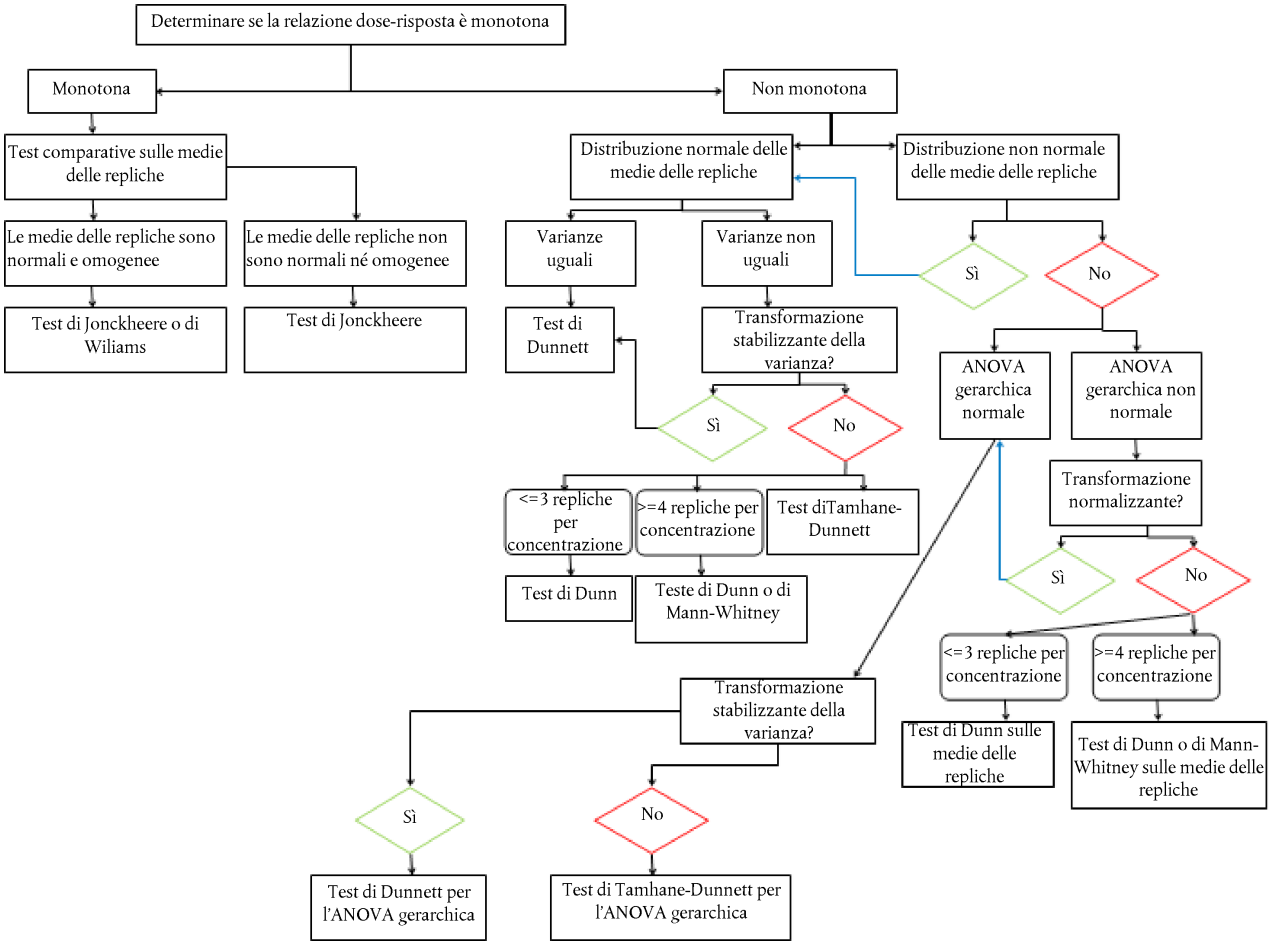
Per preparare il campione fortificato, si aggiunge una quantità nota di standard inter-prova ad un campione di plasma di esemplare maschio di controllo. Il campione sarà ulteriormente fortificato fino a raggiungere una concentrazione di vitellogenina da 10 a 100 volte superiore alla concentrazione di 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.

▼M6

Appendice 8

Diagramma decisionale per l'analisi statistica



02008R0440 — IT — 08.01.2026 — 011.001 — 1283

▼M6

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

▼M6

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 attrezzature 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° ± 1 °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 disciolto;

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

▼M6

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 materiale 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 (incluse 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/m^2). In ciascuna vasca, le condizioni sperimentali vanno mantenute ai valori seguenti: temperatura dell'acqua a 22° ± 1 °C, pH tra 6,5 e 8,5 e concentrazione di ossigeno disciolto (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 acquatica.

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,

▼M6

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 µg/l. Idealmente, tale concentrazione non deve scendere al di sotto di 0,5 µg/l. Quando la prova è eseguita con acqua deionizzata, si deve aggiungere un supplemento di iodio per raggiungere la concentrazione minima di 0,5 µg/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 consulti 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 doppiofondo formato da una griglia di plastica o acciaio inossidabile che consenta 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

▼M6

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° ± 1 °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'analoga 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 sovraffollamento 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 colturale 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 colturale). 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

▼M6

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

▼M6

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* S*ubstances 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 acquatica 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 LC_{50}. Tuttavia, potrebbero non essere disponibili dati sulla tossicità acuta per le specie utilizzate nella prova. In tal caso, può essere effettuato un test di LC_{50} 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 acquatiche (ad esempio studi di LC_{50} 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».

▼M6

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.

▼M6

Tabella 2

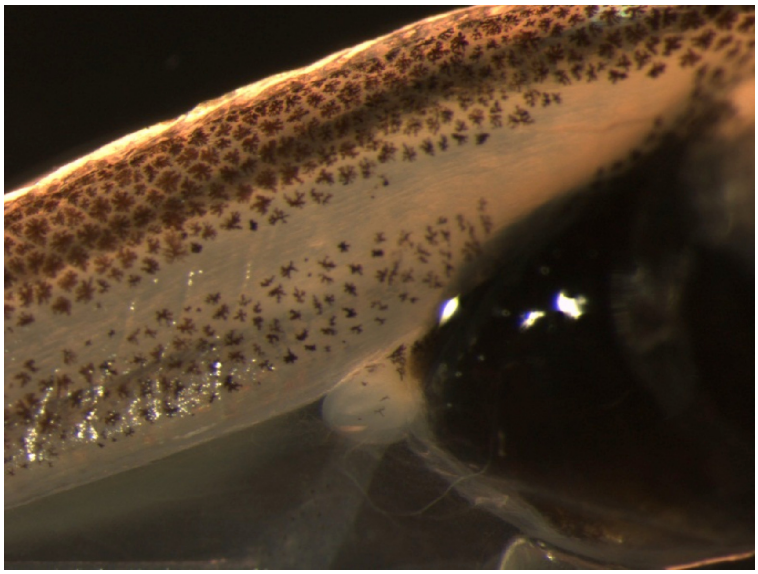
Criteri morfologici apparenti per la determinazione dello stadio di sviluppo secondo le raccomandazioni di Nieuwkoop e Faber

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	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.

▼M6

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 misurati 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.

▼M6

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			•

▼M6

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

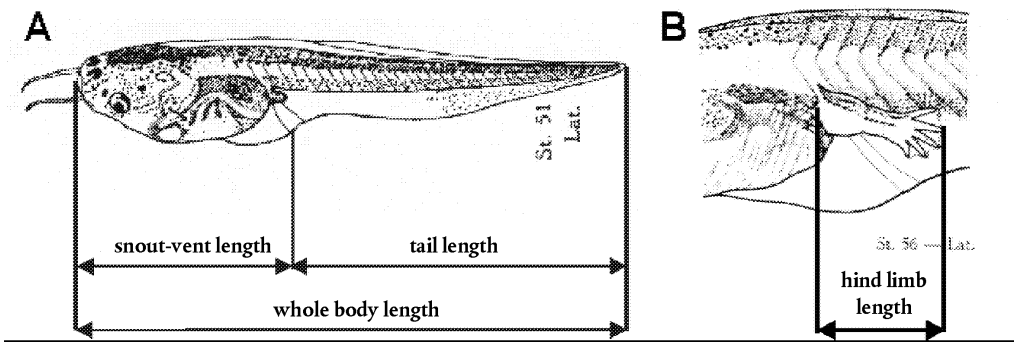
37. Le misurazioni della lunghezza dall'apice del muso alla cloaca (SVL) (Figura 2) e del peso umido sono riportate nella relazione sulla prova al fine di valutare i possibili effetti delle sostanze chimiche in esame sul tasso di crescita dei girini mediante confronto con un gruppo di controllo. Inoltre, 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.

▼M6

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 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,

▼M6

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 (comprese 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 disciolto, 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;

▼M6

— 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^{o} e al 90^{o} percentile della distribuzione dello stadio di sviluppo non presentano una differenza di oltre 4 stadi
Ossigeno disciolto	≥ 40 % del valore di saturazione dell'aria (*)
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

▼M6

Criterio	Limiti di accettabilità
Condizioni particolari per l'uso di un solvente	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.
	Le differenze statisticamente significative tra i gruppi di controllo per il solvente e per l'acqua vengono trattate in modo specifico. Cfr. infra per maggiori informazioni
Condizioni particolari per il ricorso ad un sistema con ricambio statico	Le analisi chimiche rappresentative effettuate prima e dopo il ricambio sono registrate
	Il tenore d'ammoniaca è calcolato immediatamente prima del ricambio
	Tutti i parametri relativi alla qualità dell'acqua elencati nella tabella 1 dell'appendice 1 sono misurati immediatamente prima del ricambio
	L'intervallo di tempo tra due ricambi non supera 72 ore
	Un programma di alimentazione adatto (50 % della razione giornaliera di mangimi commerciali per girini).

(*) 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.

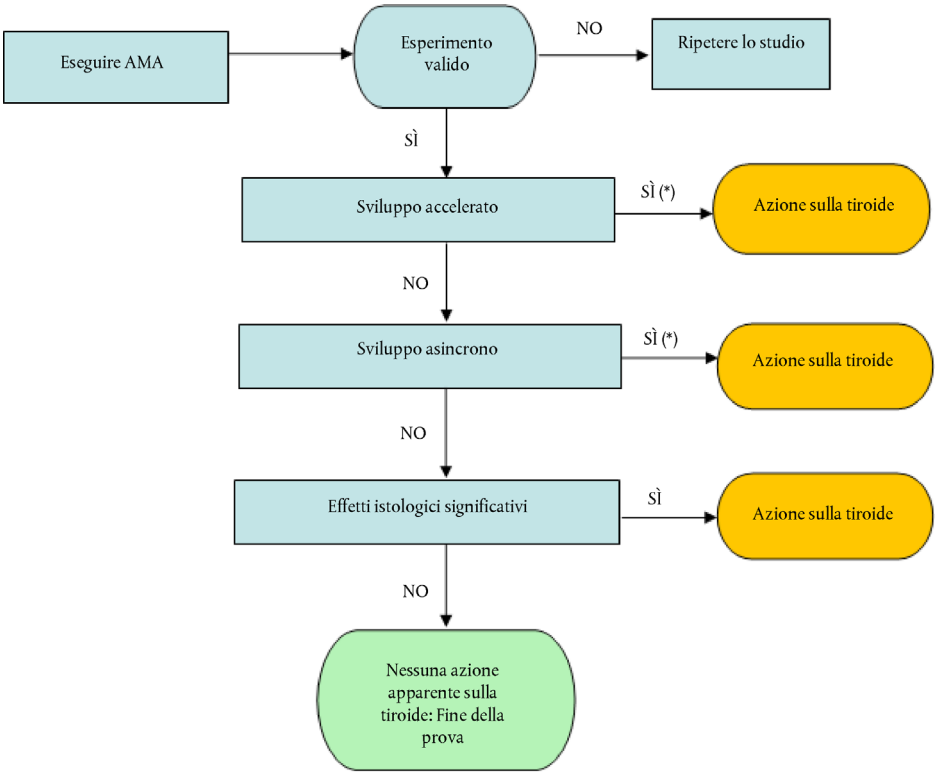
Diagramma decisionale per la conduzione della prova sulla metamorfosi degli anfibi

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.

▼M6

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.

▼**M6**

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 paramenti 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.

▼**M6**

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.

▼**M6**

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.

▼M6

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.

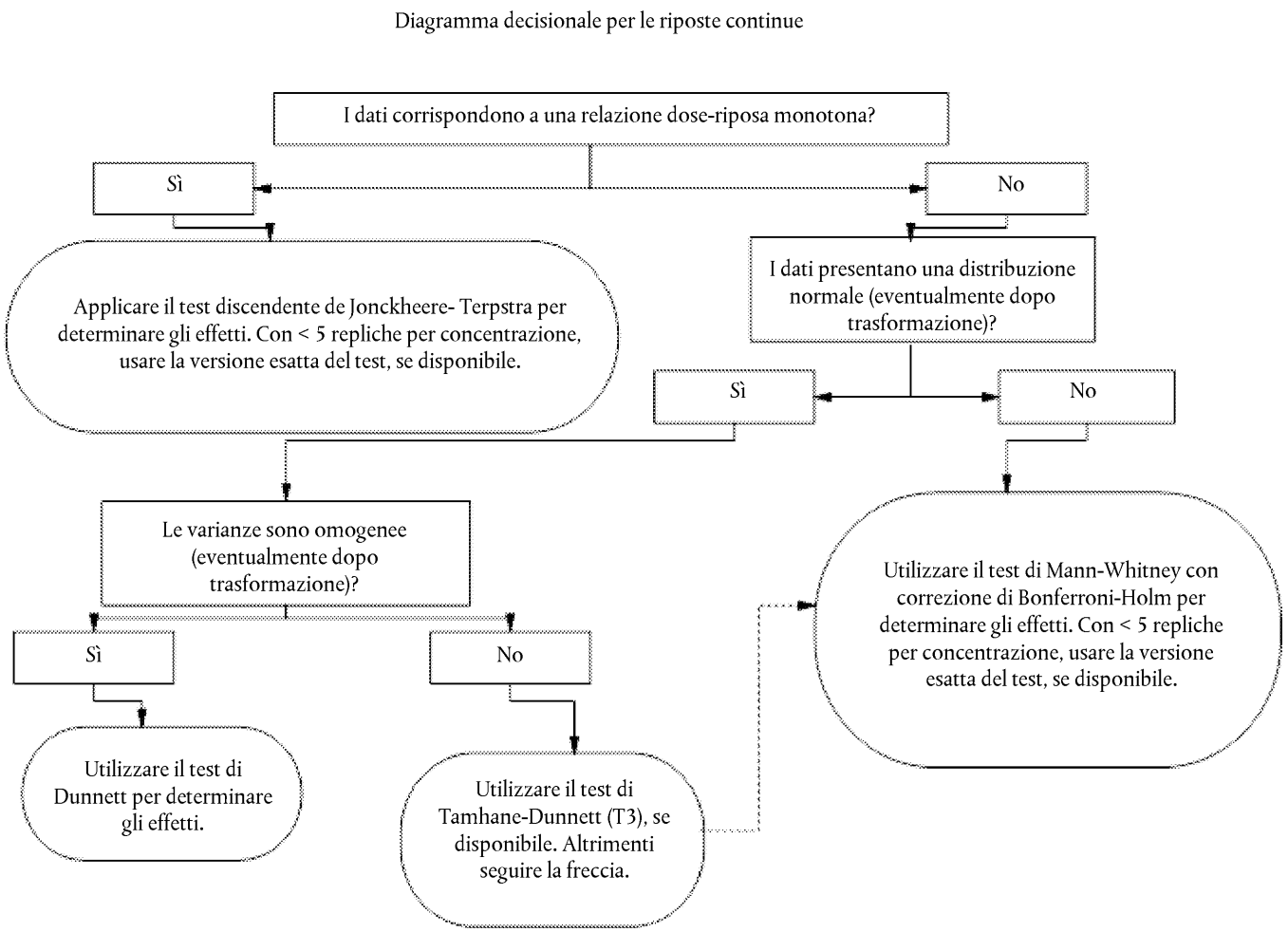
67. L'unità di analisi adeguata è la replica: pertanto, se si applica il test di Jonckheere-Terpstra o il test U di Mann-Whitney si otterranno le mediane delle repliche, mentre se si applica il test di Dunnett si otterranno le medie delle repliche. È possibile valutare visivamente il carattere monotono 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.

▼M6

Figura 4

Diagramma per determinare il metodo statistico da applicare alle risposte continue



▼M6

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 (≤ 20 %). Se il numero di girini ad uno stadio di sviluppo superiore a 60 è maggiore (≥ 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.

▼**M6**

(2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 — Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 76. Paris

(3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 92. Paris

(4) OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. 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), Philadelpia, 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.

▼M6

Appendice 1

Tabella 1

Condizioni sperimentali della Prova sulla metamorfosi degli anfibi in 21 giorni

Animali sperimentali		Larve della specie *Xenopus laevis*	
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 × 14 cm × 16,5 cm)	
Repliche		4 repliche dei recipienti di prova per concentrazione sperimentale e per ciascun controllo	
Tasso di mortalità accettabile nei controlli		≤ 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	

▼**M6**

	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 disciolto:		>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)

▼M6

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

	Concentrazione	Numero di trattamento	Numero della replica	Numero individuale	Identificatore individuale	Stadio di sviluppo	Lunghezza SVL (mm)	Lunghezza delle zampe posteriori (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							
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							

▼**M6**

	Concentrazione	Numero di trattamento	Numero della replica	Numero individuale	Identificatore individuale	Stadio di sviluppo	Lunghezza SVL (mm)	Lunghezza delle zampe posteriori (mm)	Peso del corpo umido (mg)
RIGA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIO	BL	HHL	PESO
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							
32	0,00	2							
33	0,00	2							

▼**M6**

	Concentrazione	Numero di trattamento	Numero della replica	Numero individuale	Identificatore individuale	Stadio di sviluppo	Lunghezza SVL (mm)	Lunghezza delle zampe posteriori (mm)	Peso del corpo umido (mg)
RIGA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIO	BL	HHL	PESO
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							

▼**M6**

	Concentrazione	Numero di trattamento	Numero della replica	Numero individuale	Identificatore individuale	Stadio di sviluppo	Lunghezza SVL (mm)	Lunghezza delle zampe posteriori (mm)	Peso del corpo umido (mg)
RIGA	TRT	TRT#	REP	IND	ID#	STADIO	BL	HHL	PESO
59	0,00	3							
60	0,00	3							
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

▼**M6**

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	MEDIANA	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!																

▼**M6**

Giorno di prova	Data	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!																
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:

▼**M6**

Tabella 6

Sintesi dei dati chimici

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
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!																				

Nota: I calcoli delle caselle sono associati ai dati riportati nella tabella 1.

▼**M6**

Tabella 7

Tabelle dei risultati relativi ai criteri istopatologici fondamentali

Data Sostanza chimica:

ID animale campione di controllo — Replica 1	ID animale campione di controllo — Replica 2	Ipertrofia della tiroide	Atrofia della tiroide	Ipertrofia delle cellule follicolari tiroidee	Iperplasia delle cellule follicolari tiroidee
Totale:					

ID animale esposto a trattamento — Replica 1	ID animale esposto a trattamento — Replica 2	Ipertrofia della tiroide	Atrofia della tiroide	Ipertrofia delle cellule follicolari tiroidee	Iperplasia delle cellule follicolari tiroidee
Totale:					

Patologo

ID animale esposto a trattamento — Replica 1	ID animale esposto a trattamento — Replica 2	Ipertrofia della tiroide	Atrofia della tiroide	Ipertrofia delle cellule follicolari tiroidee	Iperplasia delle cellule follicolari tiroidee
Totale:					

ID animale esposto a trattamento — Replica 1	ID animale esposto a trattamento — Replica 2	Ipertrofia della tiroide	Atrofia della tiroide	Ipertrofia delle cellule follicolari tiroidee	Iperplasia delle cellule follicolari tiroidee
Totale:					

▼**M6**

Tabella 8

Altri criteri istopatologici

Data Sostanza chimica Patologo

ID animale campione di controllo — Replica 1		Aumento della superficie del lume follicolare	Diminuzione della superficie del lume follicolare
ID animale campione di controllo — Replica 2			
Totale:			

ID animale esposto a trattamento — Replica 1		Aumento della superficie del lume follicolare	Diminuzione della superficie del lume follicolare
ID animale esposto a trattamento — Replica 2			
Totale:			

ID animale esposto a trattamento — Replica 1		Aumento della superficie del lume follicolare	Diminuzione della superficie del lume follicolare
ID animale esposto a trattamento — Replica 2			
Totale:			

ID animale esposto a trattamento — Replica 1		Aumento della superficie del lume follicolare	Diminuzione della superficie del lume follicolare
ID animale esposto a trattamento — Replica 2			
Totale:			

▼**M6**

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		

▼**M6**

ID animale esposto a trattamento — Replica 1		
ID animale esposto a trattamento — Replica 2		
ID animale esposto a trattamento — Replica 1		
ID animale esposto a trattamento — Replica 2		

▼M6

Tabella 10

Tabella riassuntiva dei dati per il giorno x (7 o 21) della Prova di metamorfosi degli anfibi

		Controllo				Trattamento 1					Trattamento 2					Trattamento 3				
Osservazione	Replica	Media	DS	CV	N	Media	DS	CV	N	Valore p	Media	DS	CV	N	Valore p	Media	DS	CV	N	Valore p
Lunghezza Le zampe posteriori (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	media:																			
SVL (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	media:																			
Peso umido (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	media:																			

02008R0440 — IT — 08.01.2026 — 011.001 — 1321

▼M6

Tabella 11

Tabella riassuntiva dei dati relativi allo stadio di sviluppo per il giorno x (7 o 21) della Prova di metamorfosi degli anfibi

		Controllo				Trattamento 1					Trattamento 2					Trattamento 3				
	Replica	Mediana	Min	Max	N	Mediana	Min	Max	N	Valore p	Mediana	Min	Max	N	Valore p	Mediana	Min	Max	Mediana	Valore p
Stadio di sviluppo	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	media:																			

02008R0440 — IT — 08.01.2026 — 011.001 — 1322

▼**M6**

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 (≥ 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.

▼**M6**

Appendice 4

Definizioni

Sostanza chimica: sostanza o miscela

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

▼M6

C.39. **PROVA DI RIPRODUZIONE DI COLLEMBOLI IN CAMPIONI DI SUOLO**

▼M9

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 3 della parte 0.

▼M6

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:

▼M6

— 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 log 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

▼M6

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 disciolto 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 cm^2 per larva. Lo spessore dello strato

([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).

▼M6

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 microtitolazione a 12 pozzetti (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 microtitolazione, 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 %);

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 ± 0,5;

f. il tenore di carbonio organico della miscela finale dovrà essere del 2 % (± 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

▼M6

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 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

▼M6

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-Haentzal.

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

▼M6

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 % (α = 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

▼M6

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 deposti. 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 cefalica (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

▼M6

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 pozzetti di una piastra per microtitolazione 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 classificarli 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 nutrite, 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

▼M6

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.

▼M6

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 deposti 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 ± 0,3 cm, o piccole, generalmente ≤ 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

▼M6

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 disciolto 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 ECx devono però essere calcolati dopo che il risultato è stato ritrasformato nel suo valore originario (31).

▼M6

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 Dunnet). È opportuno utilizzare il test di Williams se si ipotizza un rapporto dose/risposta monotonico, 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 monotonico e i tassi di emergenza corroborano questa ipotesi. In caso contrario, si può utilizzare un test esatto di Fisher o un test di Mantel-Haentzal 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-Haentzal 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'emergenza della coorte sperimentale

▼M6

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 – l (l = lunghezza dell'intervallo di osservazione, di solito 1 giorno). La velocità media di sviluppo per recipiente ($\overline{x}$) è calcolata come segue:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i X_i}{n_e}$$

dove:

$\overline{x}$: 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 (Σf_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

▼M6

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 deposti 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 deposti 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),

▼M6

— 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 disciolto, 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;

▼M6

— 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.

▼**M6**

(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. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

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

(24) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(25) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. and H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. J Soils Sediments, 9: 94-102.

(27) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics, 48: 577-585.

(28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Res., 18: 213-221.

▼**M6**

(29) Bruce, R.D. 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.

▼**M6**

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.

▼M6

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 Elendt «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 nutrite 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 abbasseranno 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.

▼M6

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 $NaSiO_3 \times 5H_2O$, $NaNO_3$, 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
$MnCl_2 \times 4H_2O$ [1]	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl [1]	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M6**

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
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \times 6H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \times 2H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \times 6H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \times 2H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \times 7H_2O$ (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)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M6**

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.

▼M6

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 (± 0,5)
Carbonato di calcio	$CaCO_3$, in polvere, chimicamente puro	0,05 - 0,1
Acqua	Conduttività ≤ 10 μS/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 ± 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 ± 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 sludgeworms (Oligochaeta) in artificial media, Ecotox. Environ. Safety, 39: 10-20.

▼**M6**

Appendice 4

Caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione accettabile

COMPONENTE	CONCENTRA-ZIONI
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

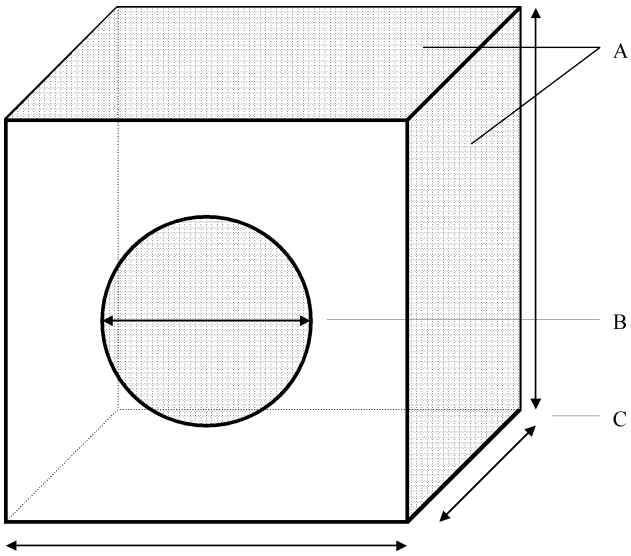
(*) Utilizzare un'acqua meno dura se si sospetta il rischio di un'interazione tra gli ioni che provocano la durezza e la sostanza chimica in esame (nel qual caso il mezzo Elendt M4 non può essere usato).

▼**M6**

Appendice 5

Indicazioni sull'esecuzione della prova

Esempio di gabbia di allevamento



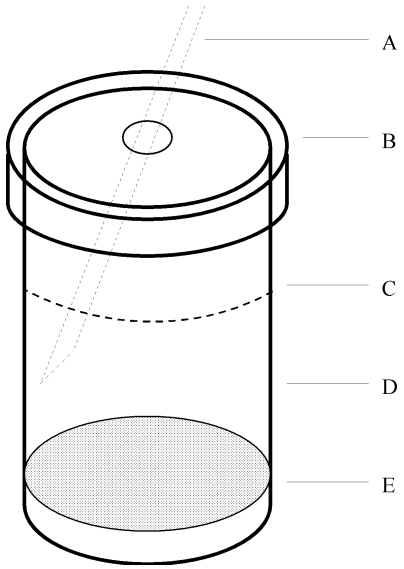
A: garza sulla parte superiore e su almeno un lato della gabbia (a maglie di circa 1 mm)

B: apertura per introdurre gli adulti emersi nella gabbia di allevamento e rimuovere dai cristallizzatori (non visibili nella figura) i cordoni di uova deposti

C: dimensioni minime della gabbia di allevamento: 30 cm di lunghezza, 30 cm di altezza e 30 cm di larghezza

▼**M6**

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

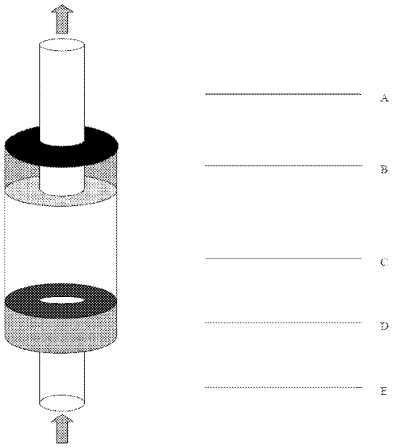
C: livello dell'acqua

D: recipiente di prova (becher di vetro con capienza di almeno 600 ml)

E: strato di sedimento

▼**M6**

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 autoadescante

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

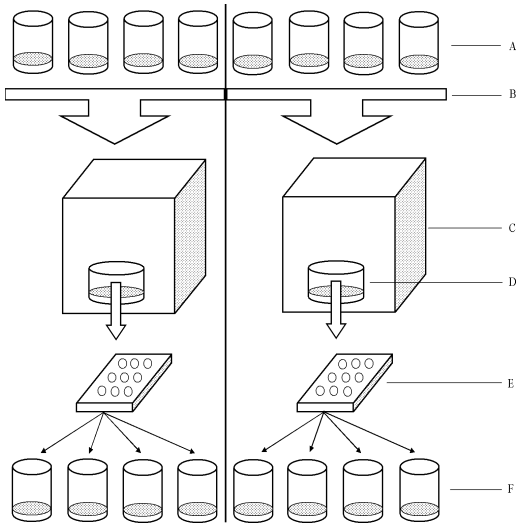
C: contenitore trasparente (di plastica o di vetro, avente una lunghezza di circa 15 cm) per i moscerini catturati

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

▼**M6**

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.

▼M6

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 sospettate 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 marcatore 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.

▼M6

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 17β-estradiolo, induce una diminuzione del livello di vitellogenina, che viene utilizzato per individuare le sostanze chimiche inibitrici 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 zebrato, *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 zebrato 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 zebrato(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

▼M6

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 biomarcatore 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 inibitrici 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

▼M6

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 ± 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):

▼M6

		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.

▼M6

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. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}) 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

▼M6

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 disciolto 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 LC_{50} 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 LC_{50} 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 LC_{50} per gli stadi di larva e di esemplare giovane.

▼M6

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 ± 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,

▼M6

— 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 $NaHCO_3$) 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

▼M6

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

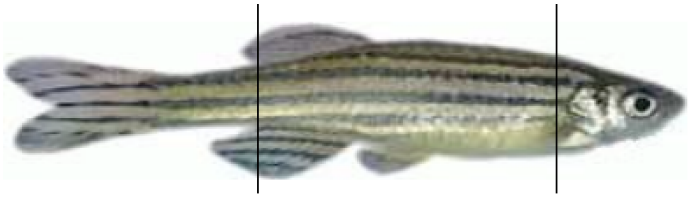
48. Il pesce è soppresso con metodo non cruento. Il fegato è estratto mediante dissezione e conservato a una temperatura pari o inferiore a – 70 °C. Le procedure raccomandate per l'escissione del fegato e il pretrattamento figurano nella linea guida n. 229 dell' OCSE (37) o nel capitolo C. 37 del presente 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.



▼M6

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 (tecnica 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, intersessuato 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

▼M6

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 ± 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 ± la deviazione standard di maschi, femmine, intersessuati e

▼M6

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 ± 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 ± 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 disciolto.

— 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,

▼M6

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 ± 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

▼M6

aculeatus L.) as a model organism for endocrine disruption — II — kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction», Aquatic Toxicology 70, pp. 311-326.

14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita, and T. Iguchi (2004), «Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka», Journal of Health Science 50, pp. 301-308.

15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson, and A. Goksoyr (2006), «Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin. Aquatic Toxicology», 78, pp. 202-206.

16) Jensen, K.M. and G.T. Ankley (2006), «Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (Pimephales promelas)», Ecotoxicology and Environmental Safety 64, pp. 101-105.

17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S, Norrgren, L., and Bjerregaard, P (2001b), «Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (Danio rerio) and rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)», Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597, pp. 48-51.

18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher, and A. Goksoyr (2004), «Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening», Analytical and Bioanalytical Chemistry 378, pp. 621-633.

19) Orn, S., S. Yamani, and L. Norrgren (2006), «Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone», Archives of Environmental Contamination and Toxicology 51, pp. 237-243.

20) Scholz, S. and N. Kluver (2009), «Effects of Endocrine 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 ethynylestradiol added to a whole lake», Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 66, pp. 1920-1935.

27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno, and C.R. Tyler (2006), «Development of chronic tests for endocrine active chemicals — Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (Pimephales promelas)», Aquatic Toxicology 77, pp. 279-290.

▼**M6**

28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren, and P. Bjerregaard (2006), «Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)», Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 144, pp. 57-66.

29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard, and P. Bjerregaard (2004), «Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (Danio rerio)», Fish Physiology and Biochemistry 30, pp. 257-266.

30) Morthorst, J.E., H. Holbech, and P. Bjerregaard (2010), «Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations», Aquatic Toxicology 98, pp. 336-343.

31) Kiparissis,Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch, and C.D. Metcalf (2003), «Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (Oryzias latipes)», Aquatic Toxicology 63, pp. 391-403.

32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley, and C.R. Tyler (2004), «Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development», Aquatic Toxicology 70, pp. 11-21.

33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen, and P. Bjerregaard (2007), «Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (Danio rerio)», Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, pp. 165-170.

34) 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-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, Danio rerio» Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A, 70, 9-10 pp 768-779.

41) OECD (2011), Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OECD, Paris.

42) OECD (2011), Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OECD, Paris.

43) OECD (2011), Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test, Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OECD, Paris.

44) 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).

▼M6

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

▼M6

Appendice 2

Condizioni sperimentali per la prova sullo sviluppo sessuale dei pesci (specie di acqua dolce)

1. Specie raccomandata	Medaka giapponese (*Oryzias latipes*)	Pesce zebra (*Danio rerio*)	Spinarello (*Gasterosteus aculeatus*)
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 $\mu E/m^2/s$, 540-1 080 lux, o 50-100 ft-c (livelli ambientali del laboratorio)	10-20 $\mu E/m^2/s$, 540-1 080 lux, o 50-100 ft-c (livelli ambientali del laboratorio)	10-20 $\mu E/m^2/s$, 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 *Artemia salina*, mangime in fiocchi, ecc. Si raccomanda di nutrire i pesci due volte al giorno.	Frittura speciale di naupli, *Artemia* vivi, esemplari adulti congelati di *Artemia salina*, mangime in fiocchi, ecc. Si raccomanda di nutrire i pesci due volte al giorno	Esemplari di *Artemia* vivi, adulti congelati di *Artemia salina*, mangime in fiocchi, ecc. Si raccomanda di nutrire i pesci due volte al giorno
14. Aerazione	Nessuna, tranne quando la concentrazione di ossigeno disciolto è inferiore al 60 % del valore di saturazione dell'aria	Nessuna, tranne quando la concentrazione di ossigeno disciolto è inferiore al 60 % del valore di saturazione dell'aria	Nessuna, tranne quando la concentrazione di ossigeno disciolto è inferiore al 70 % del valore di saturazione dell'aria

▼**M6**

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 %

▼**M6**

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

▼**M6**

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.

▼M6

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.

▼M6

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 H_2SO_4 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 H_2O 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 H_2O filtrata su membrana Millipore. Conservare a 4 °C.

(***) TMB plus è un substrato «pronto all'uso» prodotto dalla KemEnTec (Danimarca). È fotosensibile. 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.

▼**M6**

(****) PBS stock

NaCl	160,0	g
KH_2PO_4	4,0	g
$Na_2HPO_4,2H_2O$	26,6	g
KCl	4,0	g

Aggiustare il pH a 6.8 e riempire fino a 2 l con H_2O filtrata su membrana Millipore. Conservare a temperatura ambiente.

▼M6

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 si 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.

▼M6

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.

▼M6

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.

▼**M6**

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.

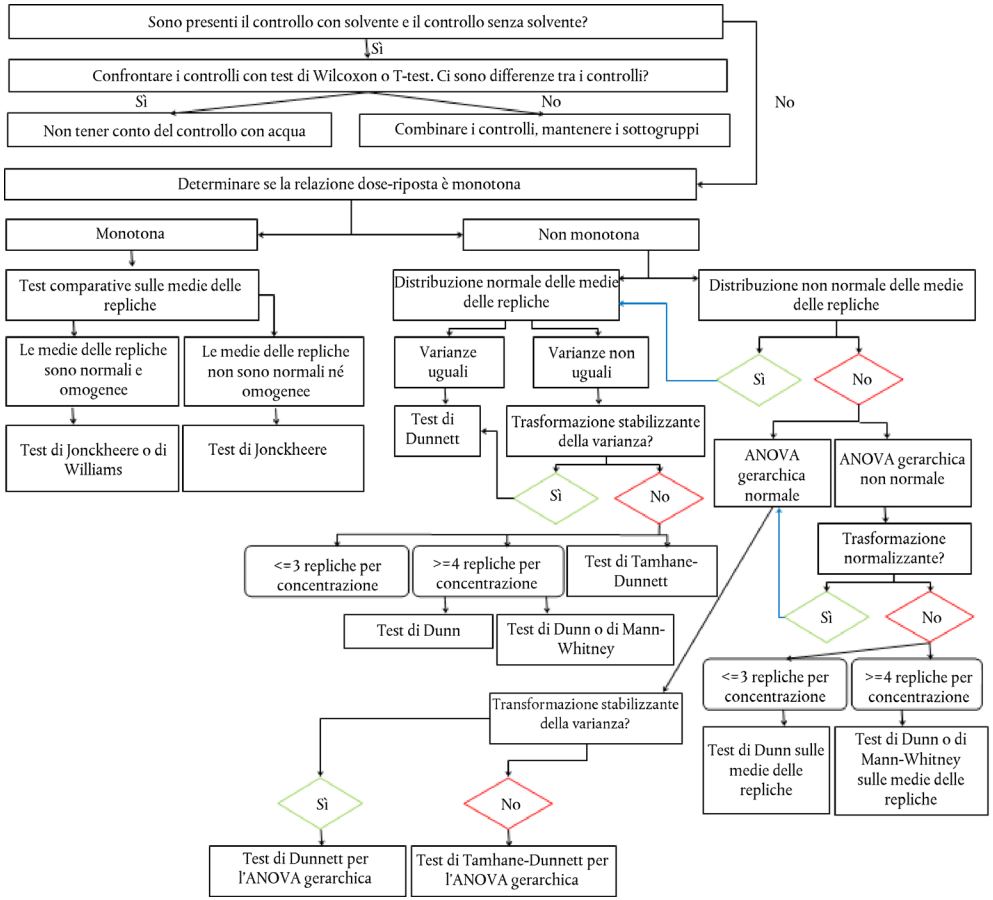
iv. Sostanza chimica / Gruppo di trattamento

v. Data

▼M6

Appendice 8

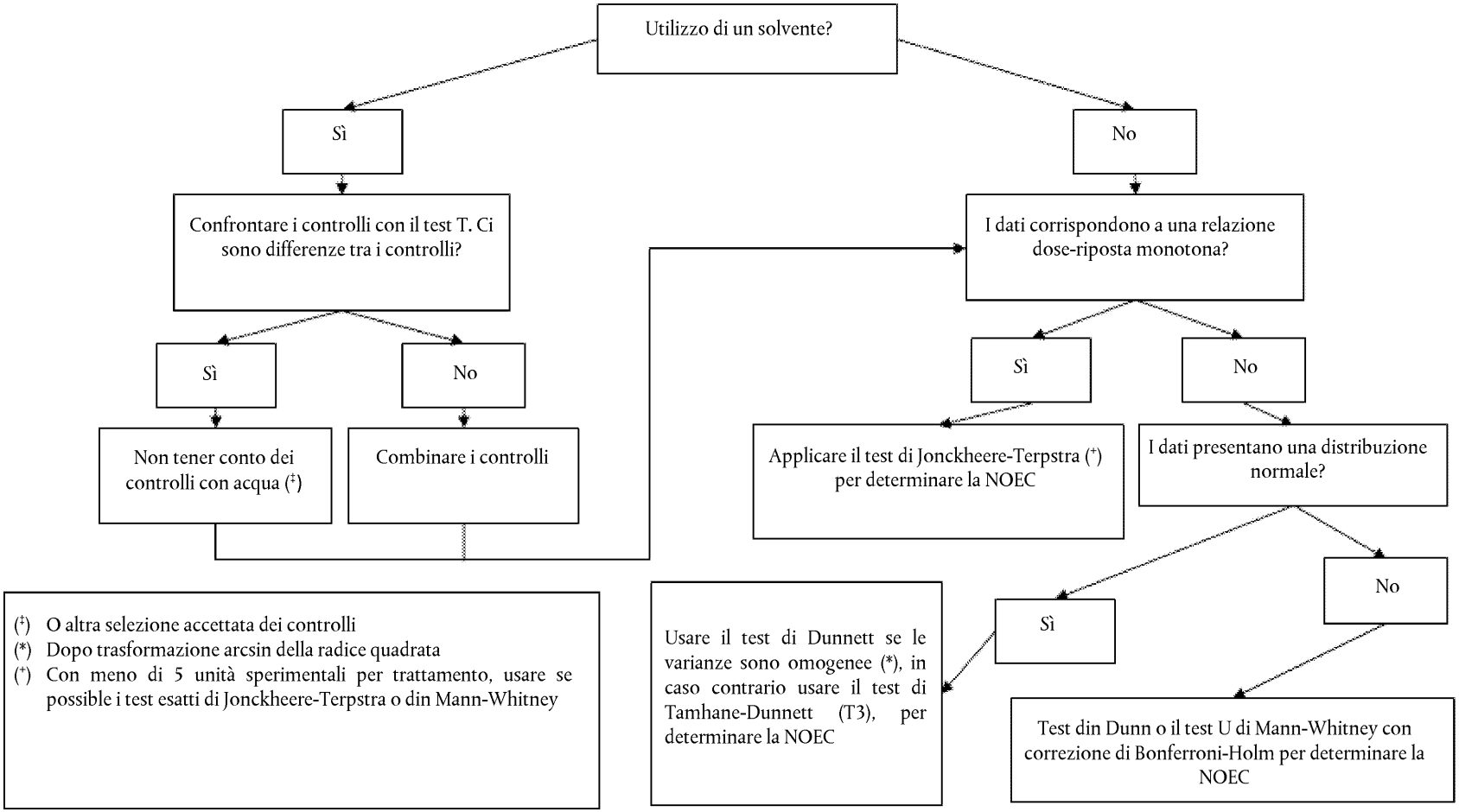
Diagramma decisionale statistico per l'analisi della vitellogenina



02008R0440 — IT — 08.01.2026 — 011.001 — 1384

▼M6

Diagramma decisionale statistico per l'analisi del rapporto numerico maschi/femmine



02008R0440 — IT — 08.01.2026 — 011.001 — 1385

▼M6

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 *Orizyas 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.

▼**M6**

1. *Preparazione della miscela di reazione (25 µl per campione):*

	Volume	Concentrazione finale
Modello di DNA	0,5µl-2µl	
Tampone 10x PCR con MgCl2	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 $(NH_4)_2SO_4$, 25mM MgCl2, 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

▼M6

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

▼**M6**

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.

▼M6

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 QIamp 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′

▼**M6**

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.

▼**M6**

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.

▼M6

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.

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_2HPO_4 (anidro)	0,358 g
KH_2PO_4	0,60 g
Acqua distillata	100 ml
Stock n. 3	
$CaCl_2$	0,72 g
Acqua distillata	50 ml

(*) Soluzione salina tamponata di Hank (HBSS)
La soluzione HBSS è necessaria per conservare lo sperma in vista di una fecondazione.

▼M6

Stock n. 4

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	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. $2H_2O$ 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

1. 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.

2. 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.

3. 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 indurire 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.

4. 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.

5. 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.

6. Ripetere la procedura con un'altra femmina finché sarà raccolto un numero di uova sufficiente.

7. Preservare alcune uova dell'ultimo lotto e fissarle in acido acetico al 10 %.

▼M6

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 6º 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.

▼M6

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 disciolto (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.

▼M6

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 ^{14}C in modo da poter misurare i tassi di scomparsa del ^{14}C organico solubile e la formazione di $^{14}CO_2$ 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	— 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	— 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	— 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	— 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 O_2 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 O_2 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.

▼M6

PRINCIPIO DELLA PROVA

3. Una quantità predeterminata della sostanza in esame è disciolta nel mezzo di prova per ottenere una concentrazione di carbonio organico disciolto (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 inibitrici. 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 disciolto 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 %

▼M6

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:

a. un agitatore che possa contenere matracci di Erlenmayer 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;

b. matracci di Erlenmeyer di 0,5-2 litri, a collo stretto;

c. apparecchio di filtrazione su membrana o centrifuga;

d. membrane filtranti di 0,2-0,45μm;

e. analizzatore di carbonio;

f. 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 eterotrofe e la determinazione delle concentrazioni di nitrato, ammonio e fosfato disciolto.

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

▼M6

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) Diidrogenoortofosfato di potassio (Fosfato monopotassico), KH_2PO_4 — 8,50 g

Idrogenoortofosfato di potassio, K_2HPO4 — 21,75 g

Sodio idrogenofosfato diidrato, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ — 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 $MgSO_4$ $7H_2O$ — 22,50 g

Sciogliere e portare il volume a 1 litro con acqua distillata.

d) Cloruro di ferro (III) esaidrato, $FeCl_3$ $6H_2O$ — 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.

▼M6

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)($HgCl_2$) ([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.

([1]) Il cloruro di mercurio (II) ($HgCl_2$) 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.

▼M6

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.

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 disciolto. 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 disciolto. 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.

▼M6

29. Se sulla curva di degradazione si osserva un plateau prima del 60simo giorno occorre porre fine alla prova. Se la degradazione è palesemente 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_o = 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;

▼M6

— 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.

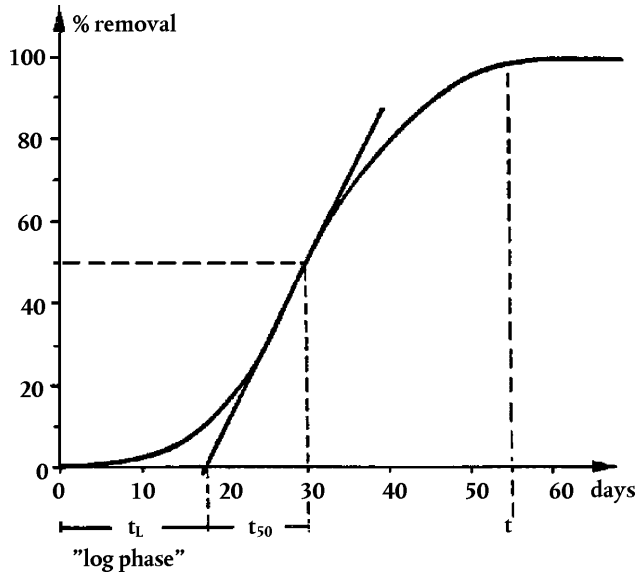
Validità e interpretazione dei risultati

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.

▼M6



METODO DELLA BOTTIGLIA CHIUSA

INTRODUZIONE

1. 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).

2. 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

3. 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.

4. 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.

▼M6

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 ultrasonicazione) 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.

▼M6

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, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	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, $MgSO_4 \cdot 7H_2$	22,50 g
	Sciogliere e portare il volume a 1 litro con acqua distillata.	
d)	Cloruro di ferro (III) esaidrato, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Sciogliere e portare il volume a 1 litro con acqua distillata.	

▼M6

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:

a) 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);

b) il valore del BOD nella prova in bianco dell'acqua di mare; e

c) la biodegradabilità attesa della sostanza in esame.

▼M6

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 O_2/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).

([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.

▼M6

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).

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:

$$\%\ biodegradazione = \frac{mg\ O_2/mg\ sostanza\ in\ esame}{mg\ ThOD/mg\ sostanza\ in\ esame} \times 100$$

$$\%\ biodegradazione = \frac{mg\ O_2/mg\ sostanza\ in\ esame}{mg\ COD/mg\ sostanza\ in\ esame} \times 100$$

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).

▼M6

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.

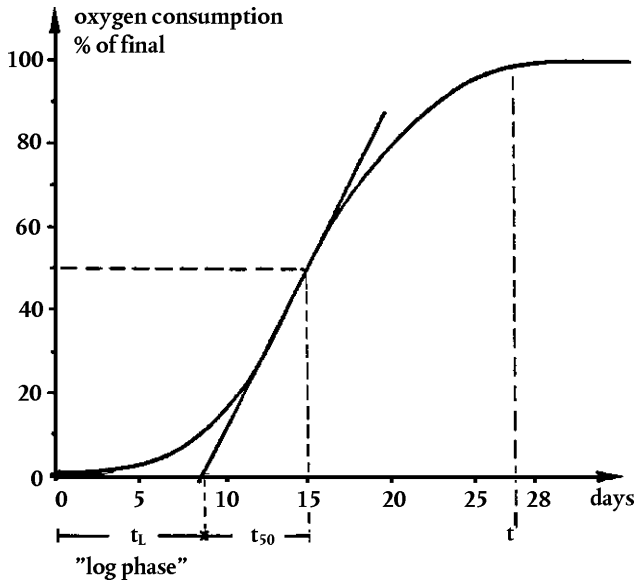
▼M6

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 inibisca 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 tL- 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: detrminazione della «pronta biodegradabilità» Parte VI Prova della bottiglia chiusa.

▼M6

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 CO_2 sviluppata è misurata mediante spettrometria a infrarossi o titrimetria. Oppure la CO_2 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 CO_2 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 CO_2 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 $HgCl_2$ e 9,6 g di $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ sono disciolti in qualche centinaia di millimetri di acqua di reazione a bassa concentrazione di carbonio;

b) 20 g di $K_2S_2O_8$ sono disciolti nella soluzione di sale mercurico;

▼**M6**

c) 5 ml di HNO_3 (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.

▼M6

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_o: 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, $C_{b(t)}$					

▼**M6**

	Matraccio n.		DOC dopo n giorni (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
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 (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) se esiste una grande differenza tra D_1 e D_2 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	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\%degradazione\ abiotica = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

▼**M6**

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:

$$ThOD_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

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

$$ThOD = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07\ mg\ O_2/mgglucosio$$

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

$$ThOD = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34\ mg\ O_2/mgsostanza$$

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.

$$ThOD_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2_p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{MW}$$

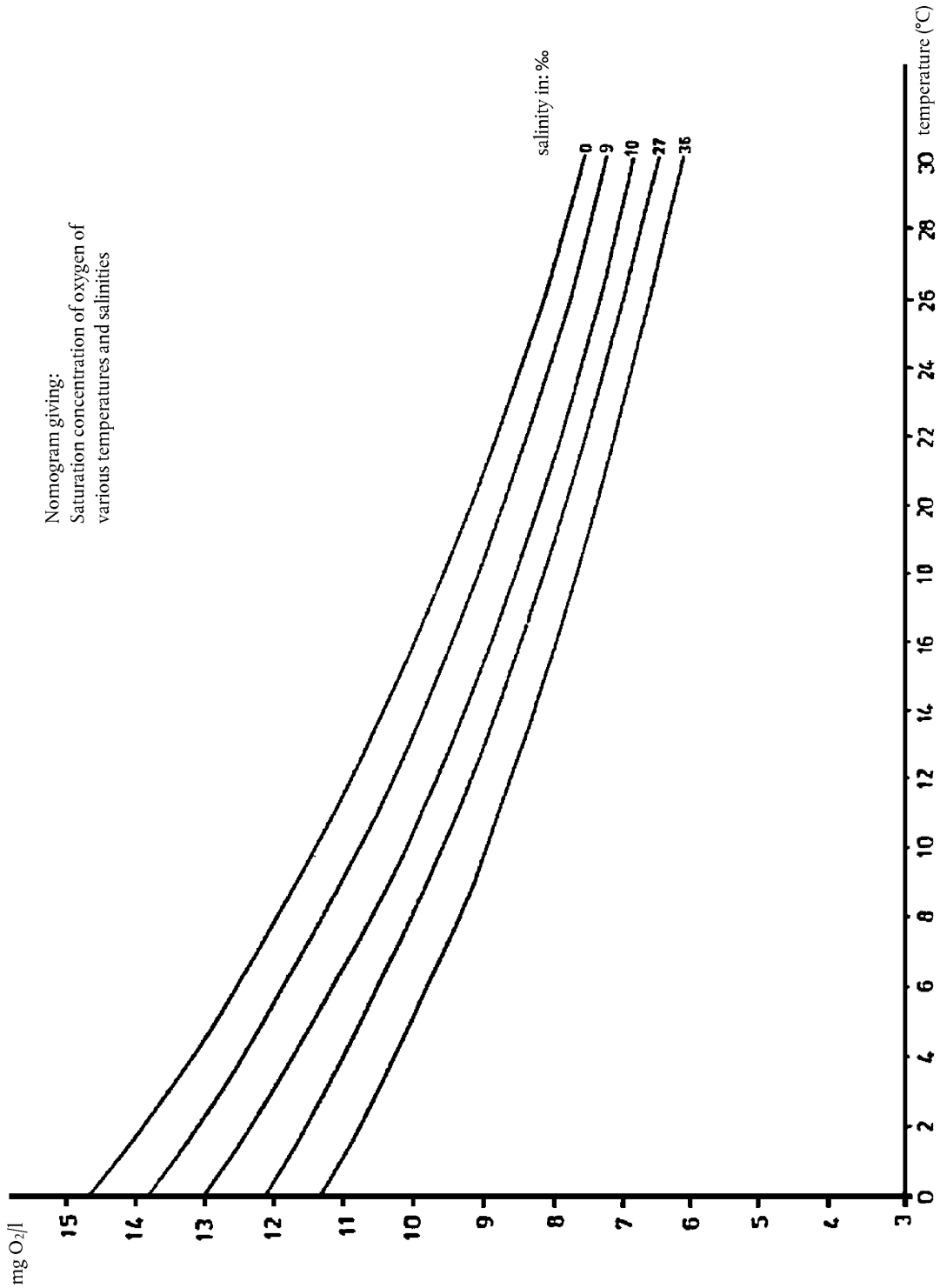
Ad esempio, se nel caso di un'ammina secondaria, l'analisi indica che l'azoto era interamente sotto forma di nitrato:

$(C_{12}H_{25})_2$ NH, di PM = 353

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44\ mg\ O_2/mgsostanza$$

▼**M6**

Appendice 4



▼M6

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 O_2/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 O_2 dopo aerazione e prima dell'inizio della prova:	mg O_2/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	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

▼**M6**

	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 disciolto dopo n giorni		
	5	15	28
$(m_b - m_t)$ [1]			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)(1)}{sostanza\ in\ esame(mg/l) \times ThOD} \times 100$			

[1] ciò presuppone che $m_{b(o)} = m_{t(o)}$, dove
$m_{b(o)}$ = valore della prova in bianco il giorno 0,
$m_{t(o)}$ = valore della sostanza in esame il giorno 0.
Se $m_{b(o)}$ non è uguale a $m_{t(o)}$, utilizzare $(m_{t(o)} - m_{t(x)}) - (m_{b(o)} - m_{b(x)})$, dove
$m_{b(x)}$ = valore della prova in bianco il giorno x,
$m_{t(x)}$ = valore della sostanza in esame il giorno x.

▼M6

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

▼M6

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 declorazione, 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 raggiuga da 1 g/l a 3 g/l e sono in seguito incubati a 35 °C ± 2 °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 CO_2 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)).

([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 disidradabilità dei fanghi. Consiste nell'associazione di batteri fermentativi e metanogenici anaerobici che producono biossido di carbonio e metano (11).

▼M6

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 n_2

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:

a. incubatore — anti-scintilla e termostatato a 35 °C ± 2 °C;

▼M6

b. 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;

c. manometro ([3]) in grado di misurare e fare sfiatare 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 sfiatare 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;

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 oC, 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.

([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.

▼M6

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 disciolto.

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 ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$))	1,12 g
Cloruro di ammonio (NH_4Cl)	0,53 g
Cloruro di calcio diidrato ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,075g
Cloruro di magnesio esaidrato ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,10 g
Cloruro di ferro (II) tetraidrato (FeCl2 · 4H2O)	0,02 g
Resazurina (indicatore di ossigeno)	0,001g
Sodio solfuro nonaidrato ($Na_2S \cdot 9H_2O$)	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 $Na_2S \cdot 9H_2O$ 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 ± 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 riducente 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 ± 0,2.

▼M6

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 esaidrato ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	100 mg
Cloruro di nichel esaidrato ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$)	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 ± 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 tetracloruro 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 ± 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)).

▼M6

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 °C ± 2 °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, i 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).

▼M6

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 ± 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 ± 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_l e dello spazio di testa V_h siano uguali in tutti i recipienti. Annotare e registrare i valori di V_l 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))

▼M6

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 °C ± 2 °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 surnatante 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 risospende l'inoculo 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).

▼M6

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 disciolto. 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 disciolto 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. H_2SO_4) 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 disciolto non sembra eccessivo. Il carbone inorganico disciolto 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.

▼M6

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/m^2), 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 N_2O) 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 (m^3);

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);

▼M6

V_h = volume dello spazio di testa nel recipiente (l);

0,1 = conversione sia per newtons/m^2 in millibar sia per m^3 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 CH_4 e 1 mol di CO_2 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:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0{,}475\Delta V \qquad \text{Equazione [6]}$$

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;

25286 = 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 Dp (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 (1).

▼M6

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 biodegrazione 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]:

▼M6

$$D_p^{\ 1} = [1 - (S_e - S_{eb})/(S_i - S_{ib})] \times 100 \qquad \text{Equazione [13]}$$

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.

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.

([1]) Ciò va rivalutato se si includono sostanze chimiche di riferimento adsorbibili e insolubili.

▼M6

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.

▼M6

(10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.

(11) International Organization for Standardization (1995) ISO 11 734 Water Quality — Evaluation of the ultimate anaerobic biodegradation of organic compounds in digested sludge — Method by measurement of the biogas production.

(12) International Organization for Standardization (2003) ISO 13 641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1 General Test.

(13) International Organization for Standardization (1995) ISO 10 634 Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

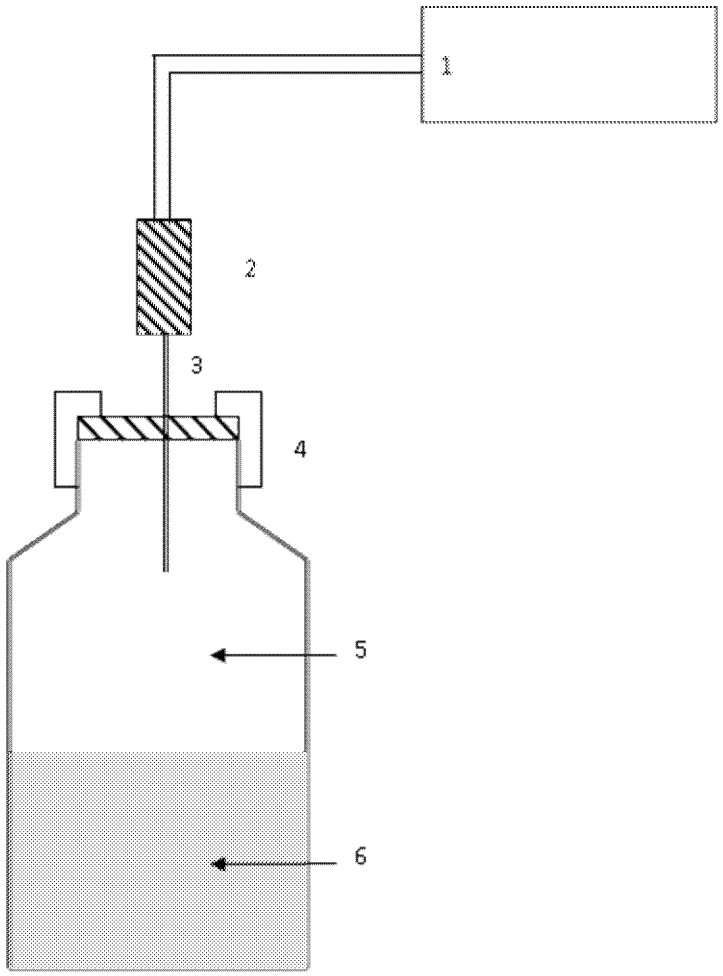
(14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, 1499-1509.

(15) International Organization for Standardization (1997) ISO 11 923 Water Quality — Determination of suspended solids by filtration through glass-fibre filters.

▼**M6**

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 °C ± 2 °C

▼M6

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 °C ± 2 °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 °C ± 2 °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 °C ± 2 °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;

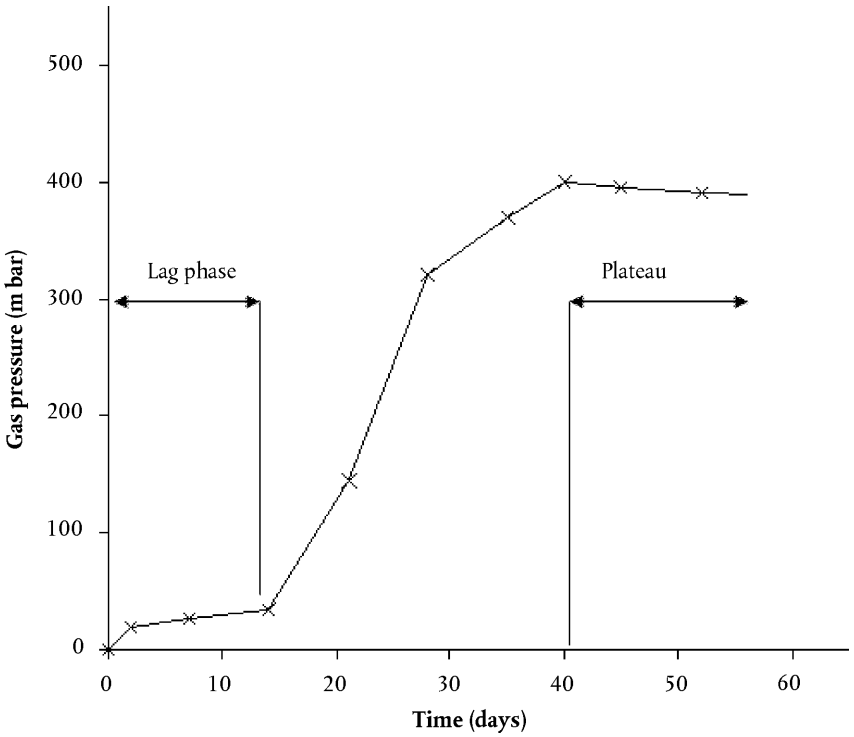
— ripetere l'intera procedura utilizzando 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml e 50 ml di aria;

— 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.

▼**M6**

Appendice 3

Esempio di curva di degradazione (aumento cumulativo netto della pressione)



▼M6

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 $C_{c,v}$: .....(mg/l) m_v ([1]): .....(mg)

Giorno	p_1 (prova) (mbar)	p_2 (prova) (mbar)	p_3 (prova) (mbar)	p (prova) media (mbar)	p_4 (bianco) (mbar)	p_5 (bianco) (mbar)	p_6 (bianco) (mbar)	p (bianco) media (mbar)	p (netto) prova — bianco media (mbar)	$D\ p$ (netto) totale cumulato (mbar)	m_h spazio di testa C ([2]) (mg)	D_h Biodegradazione ([3]) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ prova (mg)	$C_{IC,\ 2}$ prova (mg)	$C_{IC,\ 3}$ prova (mg)	C_{IC} mezzo di prova (mg)	$C_{IC,\ 4}$ bianco (mg)	$C_{IC,\ 5}$ bianco (mg)	$C_{IC,\ 6}$ bianco (mg)	C_{IC} media bianchi (mg)	$C_{IC,\ net}$ prova — bianco media (mg)	m_l liquido C ([4]) (mg)	m_t totale C ([5]) (mg)	D_t biodegradazione ([6]) (%)
Carbonio inorganico (fine)												
pH (fine)												

([1]) Carbonio nel recipiente di prova, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

([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 × Vl

([5]) Carbonio gassificato totale, mt (mg): mt + ml

([6]) Biodegrazione totale, Dt (%): Dt = (mt × 100) / mv

02008R0440 — IT — 08.01.2026 — 011.001 — 1440

▼M6

Laboratorio: ..... Sostanza di riferimento: ..... Test n.: .....

Temperatura di prova (°C): ..... Volume dello spazio di testa (V_h): .....(l) Volume del liquido (V_l): .....(l)

Carbonio nella sostanza di riferimento $C_{c,v}$ (mg/l): ..... m_v ([1]) (mg):

Giorno	p_1 (rif.) (mbar)	p_2 (rif.) (mbar)	p_3 (rif.) (mbar)	p (rif. media (mbar)	p_4 (inib.) (mbar)	p_5 (inib.) (mbar)	p_6 (inib.) (mbar)	p (inib.) media (mbar)	p (rif.) rif. — bianco (mbar)	D p (rif.) cumulativo (mbar)	m_h spazio di testa C ([2]) (mg)	D_h Biodegradazione ([3]) (%)
	$C_{IC,\ 1}$ Rif. (mg)	$C_{IC,\ 2}$ Rif. (mg)	$C_{IC,\ 3}$ Rif. (mg)	C_{IC} media rif. (mg)	$C_{IC,\ 4}$ inib. (mg)	$C_{IC,\ 5}$ inib. (mg)	$C_{IC,\ 6}$ inib. (mg)	C_{IC} media inib. (mg)	$C_{IC,\ net}$ rif. — inib. (mg)	m_l liquido C ([4]) (mg)	m_t Totale C ([5]) (mg)	D_t Biodegradazione ([6]) (%)
Carbonio inorganico (fine)												
pH (fine)												

([1]) Carbonio nel recipiente di prova, m_v (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$
([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_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$
([5]) Carbonio gassificato totale, m_t (mg): $m_t + m_l$
([6]) Biodegrazione totale, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

▼M6

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. con ^{14}C) 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

([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.

▼M6

della sostanza chimica in esame) e le determinazioni dei bilanci di massa presuppongono l'utilizzo di materiale radiomarcato. Si raccomanda la marcatura con ^{14}C ma possono essere utili anche altri isotopi, come ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. 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.

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).

▼M6

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 mg $\cdot$ 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.

▼M6

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]).

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

([1]) La quantità da applicare alle colonne di suolo cilindriche può essere calcolata pondente la formula seguente:

$$M\ [\mu g] = \frac{A\ [kg/ha] \cdot 10^9 [\mu g/kg] \cdot d^2 [cm^2] \cdot \pi}{10^8 [cm^2/ha] \cdot 4}$$

dove:

M = quantità applicata per colonna [µg]

A = tasso di applicazione [$kg \cdot ha^{-1}$]

d = diametro della colonna di suolo [cm]

π = 3,14

▼M6

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

▼M6

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 disgregazione 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, l'aggiunta 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 $CaCl_2$), 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 colonna di suolo non affonda più. La riproducibilità dei

([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.

▼M6

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 ([1]); il peso delle colonne destinate alla riproduzione della prova (duplicato) deve essere simile.

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, sospensioni 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 ([2]).

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 ≥ 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 proporzionata 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

([1]) 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}.

([2]) 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.

▼M6

di produrre notevoli quantità di prodotti di trasformazione; si raccomanda un periodo di invecchiamento equivalente alla emivita della sostanza in esame ([1]), 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 stagionati (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.

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 cromatografica (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.

([1]) 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.

▼M6

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.

▼M6

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

▼**M6**

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 Peeper, 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.

▼M6

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 $CaCl_2$ 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 $\geq$ 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 CO_2 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).

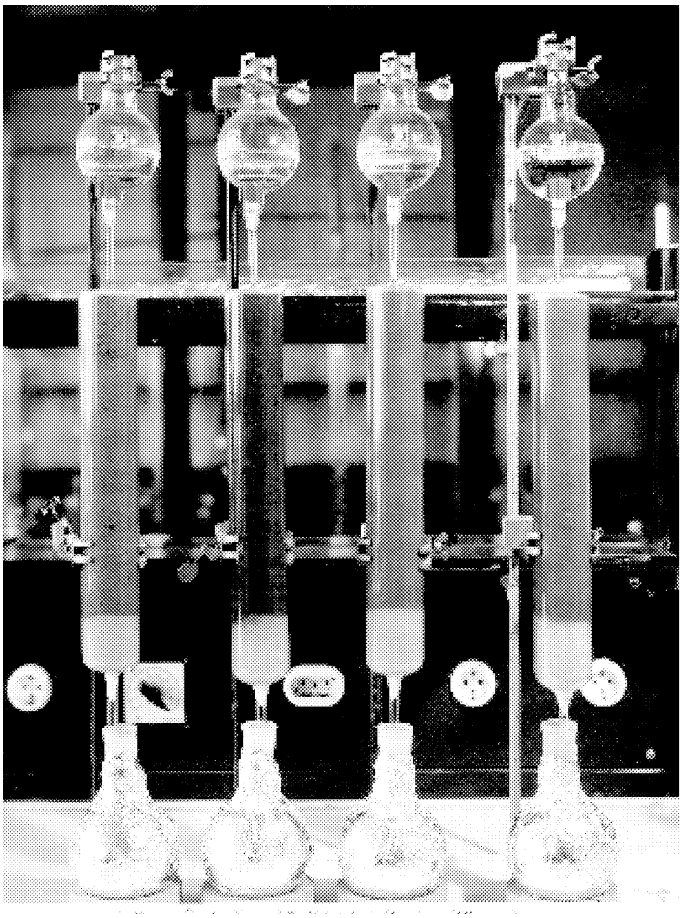
▼M6

Appendice 2

Figura 1

Esempio di colonne di lisciviazione in vetro non sezionabili

lunghezza 35 cm e diametro interno di 5 cm (1)



← Imbuti separatori per l'applicazione della pioggia artificiale

← Disco in vetro sinterizzato per proteggere la superficie del suolo da disturbi e garantire una distribuzione omogenea della pioggia artificiale

← Colonna di vetro riempita con il suolo in esame (se la sostanza in esame è fotolabile la colonna deve essere avvolta in un foglio di alluminio)

← Strato di sabbia di quarzo

← Tampone di lana di vetro per trattenere il suolo nella colonna

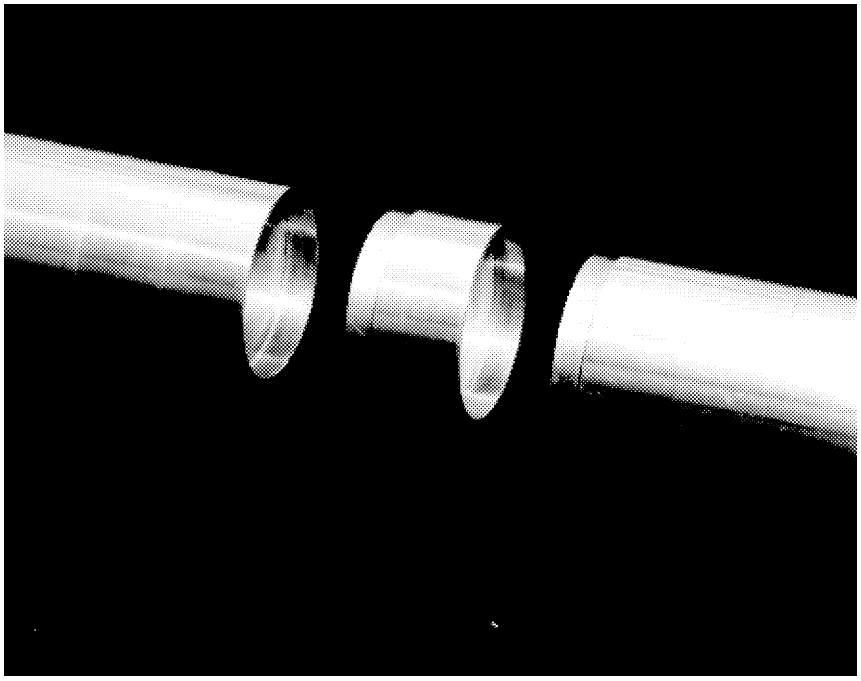
← Pallone a fondo tondo per la raccolta del percolato; avvolto in un foglio d'alluminio per escludere la fotolisi

(1) Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden — 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

▼M6

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.

▼**M6**

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 \big(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.

▼M6

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 comparti 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/m^2/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).

▼M6

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/m^2/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.

▼M6

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 × 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 × 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.

▼M6

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 cm^2/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/m^3) è calcolata con la seguente equazione:

$$\frac{\text{Massa dopo il trattamento(kg)} - \text{Massa prima del trattamento(kg)}}{\text{Soluzione Concentrazione}(m^3)} \times \frac{\%\ \text{massa(massa/Volume del campione di prova } (m^3))}{100}$$

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 e il tasso di applicazione (ad es. litri/m^2) 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.

▼M6

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/m^2/giorno è effettuato dividendo la media delle tre misurazioni di tre repliche per il numero di giorni di immersione.

▼M6

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/m^3 o l/m^2, 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/m^2 o kg/m^3;

— 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.

▼M6

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	

▼M6

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.

▼M6

Crono-logia	Cambio del-l'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				

02008R0440 — IT — 08.01.2026 — 011.001 — 1465

▼M6

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

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	mg/m^2	mg/m^2	mg/m^2	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$	$mg/m^2/d$
6h																
24h																
2 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.

02008R0440 — IT — 08.01.2026 — 011.001 — 1466

▼**M6**

Appendice 2

Definizioni

Sostanza chimica: sostanza o miscela.

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

▼M6

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_s) 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

▼M6

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

▼M6

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 mediana (CL_{50}) 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 (EC_{50}). 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).

▼M6

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 (BAFss) 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 sottoponendo 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.

▼M6

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 solfato 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

▼M6

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.

▼M6

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 essiccamento. 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 sperimentali 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

▼M6

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 sperimentali 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.

▼M6

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 sconsiglia 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 ≥ 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.

▼M6

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 ± 2 °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 cinetiche 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 cinetica 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.

▼M6

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 ammoniaca	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.

▼M6

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

▼M6

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'adsorbimento 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

▼M6

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);

▼M6

— 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 ammoniaca 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 disciolto, 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 ammoniaca, durezza totale, e concentrazione dell'ossigeno disciolto;

— 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);

▼**M6**

— 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.

▼M6

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}.

▼M6

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 l'aggiunta 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 carbone 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.

▼M6

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_s) e la costante di velocità di eliminazione (k_e) consiste nel ricorrere a metodi informatici di stima parametrica non lineare. Data una serie temporale di fattori di accumulo medi (C_a, 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

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[equazione 1]}$$

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:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[equazione 2]}$$

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 cinetiche 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 cinetica di eliminazione.

▼M6

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 compartimento singolo (equazione 4).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[equazione 3]}$$

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:

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad \text{[equazione 4]}$$

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):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \qquad \text{[equazione 5]}$$

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):

$$\boldsymbol{NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \textit{ a fine eliminazione}(\textit{media}) \times 100}{C_a \textit{ allo stato stazionario}(\textit{media})}}$$

▼M6

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 ± 2 °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).

▼**M6**

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).

▼**M6**

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 $CaCl_2 2H_2O$ in acqua deionizzata; portare ad 1 litro con acqua deionizzata.

(b) Soluzione di solfato di magnesio

Dissolvere 4,93 g di $MgSO_4 7H_2O$ 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 μScm^{-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 $K_{S4.3}$ 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.

▼M6

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 ≤ 0,5 mm)	2 ± 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 ± 1
Fonte alimentare	*Folia urticae*, foglie in polvere di *Urtica sp.* (ortica), finemente macinate (granulometria ≤ 0,5 mm), o una miscela di foglie in polvere di *Urtica 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 ≤ 10 µS/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 ≤ 0,5 mm)

Preparazione

Far essiccare all'aria e macinare finemente la torba (granulometria ≤ 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 ± 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 ± 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)

▼M6

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 ricoprirlo 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.

▼M6

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/m^2 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 cm^2 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.

▼M6

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

▼M6

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 ± 2° 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

▼M6

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 ≤63 μm), 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 ±2 °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 disciolto, 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.

▼**M6**

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 spliked 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., Schallnaß, 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.

▼M6

(14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim

(15) Landrum, P.F., Lee II, H., & Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1709-1725.

(16) Markwell, R.D., Connell, D.W. & Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. Wat. Res. 23, 1443-1450.

(17) Gabric, A.J., Connell, D.W. & Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. 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 — CO_2 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.

▼M6

(25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke & G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(26) Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of 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., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of Limnodrilus hoffmeisteri using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

(36) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(37) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(38) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

(39) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. Tubifex tubifex (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.

▼**M6**

(40) 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. & Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10, 1431-1436.

(49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985). 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.

▼**M6**

(57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail Orchesella cincta. Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(58) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

(59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. Arch. Hydr. 63, 310-386.

(60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. Environ. Sci. Technol. 21, 785-790.

(61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 47-67.

(62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, 69-78.

(63) Rodriguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(65) Egeler, Ph., Meller, M., schallnaß, H.J. & gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the 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.

▼M7

C.47. PROVA DI TOSSICITÀ SUI PESCI NEI PRIMI STADI DI VITA

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 210 (2013). Le prove effettuate sui pesci nei primi stadi di vita sono destinate a determinare gli effetti letali e subletali delle sostanze chimiche sulle specie in esame, nei suddetti stadi di sviluppo. Esse forniscono informazioni preziose per la valutazione degli effetti letali e subletali cronici della sostanza chimica in esame su altre specie di pesci.

2. La linea guida n. 210 si basa su una proposta del Regno Unito discussa durante una riunione di esperti dell'OCSE tenutasi a Medmenham (Regno Unito) nel novembre 1988 e nuovamente aggiornata nel 2013 per tenere conto dell'esperienza acquisita con il suo uso e delle raccomandazioni formulate nel corso di un seminario dell'OCSE sulle prove di tossicità dei pesci, tenutosi nel settembre 2010 (1).

PRINCIPIO DELLA PROVA

3. Si espongono i pesci nei primi stadi di vita a una serie di concentrazioni della sostanza chimica in esame disciolta in acqua. Sono da privilegiarsi condizioni a flusso continuo, ma, se non fossero possibili, si ammettono condizioni semistatiche. Per maggiori informazioni si consulti il documento d'orientamento dell'OCSE sulle prove di tossicità in ambiente acquatico di sostanze o miscele difficili (2). La prova ha inizio con la collocazione delle uova fecondate nelle vasche di prova e dura fino a quando i pesci di controllo raggiungono lo stadio giovanile; la durata dipende dalla specie in esame. Si valutano gli effetti letali e subletali e li si confronta con i valori del controllo, allo scopo di determinare la concentrazione minima alla quale si osserva un effetto (LOEC) e, in seguito, i) la concentrazione senza effetti osservati (NOEC) e/o ii) l'EC_x (ad esempio, EC_{10}, EC_{20}), utilizzando un modello di regressione per stimare la concentrazione che produce una variazione di x % dell'effetto misurato. Le concentrazioni con effetto e i parametri da riportare nella relazione possono dipendere dal quadro normativo applicabile. Le concentrazioni di prova devono includere l'EC_x, affinché essa sia ricavata per interpolazione anziché per estrapolazione (si vedano le definizioni nell'appendice 1).

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA CHIMICA IN ESAME

4. Con «sostanza chimica in esame» s'intende ciò che è sottoposto a prova: occorre conoscerne l'idrosolubilità (cfr. capitolo A.6 del presente allegato) e la pressione di vapore (cfr. capitolo A.4 del presente allegato), e disporre di un metodo d'analisi affidabile per la sua determinazione quantitativa nelle soluzioni di prova, la cui precisione e il limite di quantificazione siano noti e descritti in letteratura. Pur non essendo necessaria, una prova di tossicità acuta (cfr. i capitoli C.1 o C.49 del presente allegato) eseguita di preferenza sulla stessa specie scelta per la presente prova, può fornire informazioni utili.

5. Se il presente metodo è utilizzato per saggiare una miscela, la composizione di quest'ultima dovrebbe essere per quanto possibile caratterizzata, in particolare, mediante l'identità chimica dei suoi componenti, i quantitativi in cui sono presenti e le loro proprietà in quanto sostanze (come quelle di cui sopra). Prima di utilizzare il metodo di prova per saggiare una miscela a fini regolamentari, occorre verificare se genererà risultati accettabili per il fine regolamentare previsto.

6. La formula strutturale, il grado di purezza della sostanza, l'idrosolubilità, la stabilità in acqua e alla luce, il pK_a, il P_{ow} e i risultati di una prova di pronta biodegradabilità (secondo i capitoli C.4 o C.29 del presente allegato, ad esempio) sono informazioni utili.

▼M7

VALIDITÀ DELLA PROVA

7. Affinché la prova sia valida devono essere soddisfatte le seguenti condizioni:

— concentrazione dell'ossigeno disciolto superiore al 60 % del valore di saturazione in aria per tutta la durata della prova;

— differenza della temperatura dell'acqua tra le diverse vasche di prova o tra giorni consecutivi non superiore a ± 1,5 °C in qualsiasi momento della prova, e mantenimento della temperatura dell'acqua nell'intervallo di temperatura indicato per la specie utilizzata (appendice 2);

— misurazione analitica delle concentrazioni di prova;

— tasso complessivo di sopravvivenza delle uova fecondate e dopo la schiusa nel controllo e, se del caso, nel controllo del solvente, uguale o superiore ai valori limite definiti nell'appendice 2.

8. Se si osserva una lieve deviazione dai criteri di validità, se ne analizzano le conseguenze per l'attendibilità dei dati della prova e si riporta tale analisi nella relazione. Gli effetti sulla sopravvivenza, sulla schiusa e sulla crescita osservati nel controllo del solvente, rispetto al controllo negativo, sono discussi nell'ottica dell'affidabilità dei dati della prova e riportati nella relazione.

DESCRIZIONE DEL METODO

Vasche di prova

9. Le vasche di prova possono essere di vetro, acciaio inossidabile o altro materiale chimicamente inerte. Data la forte capacità che il silicone notoriamente possiede di assorbire le sostanze lipofile, l'uso di tubi in silicone negli studi a flusso continuo e di sigillanti in silicone a contatto con l'acqua deve essere ridotto al minimo scegliendo, ad esempio, acquari in vetro monoblocco. Le dimensioni delle vasche devono essere tali da consentire una corretta crescita del gruppo di controllo, mantenere la concentrazione dell'ossigeno disciolto (ad esempio, con le specie ittiche di piccola taglia ciò è possibile con vasche da 7 litri) e rispettare i criteri del tasso di carico di cui al paragrafo 19. Si consiglia di collocare le vasche in modo casuale nella zona in cui è condotta la prova, di preferenza secondo uno schema non completamente casuale ma casuale per blocchi, nel quale tutte le concentrazioni siano rappresentate in ciascun blocco. Le vasche di prova devono essere protette da disturbi indesiderati. È preferibile che, prima dell'introduzione degli organismi, il sistema di prova sia esposto alle concentrazioni previste della sostanza chimica in esame per un tempo sufficiente a dimostrare la stabilità delle concentrazioni.

Scelta delle specie

10. Le specie ittiche raccomandate figurano nella tabella 1. Possono essere impiegate altre specie, ma il protocollo potrebbe dover essere adattato per creare condizioni sperimentali idonee. In tal caso occorre giustificare la scelta della specie e descrivere il metodo sperimentale.

Pesci riproduttori

11. Per il mantenimento dei pesci riproduttori in condizioni soddisfacenti, si rimanda all'appendice 3 e ai riferimenti bibliografici (3) (4) (5).

Manipolazione delle uova fecondate, degli embrioni e delle larve

12. Inizialmente, le uova fecondate, gli embrioni e le larve possono essere esposti in vasche più piccole di vetro o acciaio inossidabile collocate all'interno del recipiente principale e i cui lati o estremità siano costituiti di una rete che permetta alla soluzione di prova di scorrere. Un modo di creare un

▼M7

flusso non turbolento attraverso queste vasche più piccole consiste nel sospenderle a un braccio che le muova verticalmente mantenendo però sempre sommersi gli organismi. Le uova fecondate di Salmonidi possono essere poste su supporti o reti con aperture sufficientemente grandi da poter essere attraversate dalle larve dopo la schiusa.

13. Dopo la schiusa si rimuovono i recipienti, le griglie o le reti eventualmente utilizzati per isolare le uova all'interno della vasca principale di prova, seguendo le indicazioni di cui all'appendice 3, mantenendo però le reti necessarie a evitare che le larve escano. Se occorre trasferire le larve, si avrà cura di non esporle all'aria e di non utilizzare retini per estrarle dai recipienti contenenti le uova. Il momento del trasferimento dipende dalla specie e va indicato nella relazione. Questo trasferimento, tuttavia, non è sempre necessario.

Acqua

14. Si può utilizzare qualsiasi tipo di acqua nella quale la specie studiata presenti tassi adeguati di sopravvivenza a lungo termine e di crescita (cfr. appendice 4). La qualità dell'acqua deve essere costante durante l'intera prova. Per escludere l'eventualità che l'acqua di diluizione influisca indebitamente sui risultati della prova (ad esempio, per complessazione della sostanza chimica in esame) o abbia effetti negativi sui pesci riproduttori si prelevano periodicamente dei campioni per analizzarli. Si determina il tenore di metalli pesanti (ad esempio, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), dei principali anioni e cationi (ad esempio, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, $SO4^{2-}$), dell'ammoniaca, dei pesticidi clorurati residui totali, del carbonio organico totale e dei solidi in sospensione; se è noto che la qualità dell'acqua di diluizione si mantiene relativamente costante, queste misurazioni si possono effettuare, ad esempio, due volte all'anno. Se è noto che la qualità dell'acqua è variabile, le misurazioni sono effettuate con maggiore frequenza, in funzione del grado di variabilità. Alcune caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione accettabile sono indicate nell'appendice 4.

Soluzioni di prova

15. Nelle prove a flusso continuo, per immettere nelle vasche la serie di concentrazioni prescelta, occorre un sistema che eroga e diluisce ininterrottamente una soluzione madre della sostanza chimica in esame (ad esempio, una pompa dosatrice, un diluitore proporzionale, un sistema di saturazione). Il flusso della soluzione madre e quello dell'acqua di diluizione devono essere controllati regolarmente e non devono variare di oltre il 10 % durante l'intera prova. Si considera adeguato un flusso equivalente ad almeno cinque volte il volume della vasca di prova su 24 ore (3). Tuttavia, se il tasso di carico di cui al paragrafo 19 è rispettato, si ammette un flusso minore, ad esempio doppio o triplo rispetto al volume della vasca di prova, per impedire l'evacuazione troppo rapida del cibo.

16. Si preparano le soluzioni di prova per diluizione di una soluzione madre fino alle concentrazioni scelte. La soluzione madre è preparata di preferenza per semplice miscela o agitazione della sostanza chimica in esame nell'acqua di diluizione, con l'ausilio di mezzi meccanici (agitazione e/o ultrasuoni, ad esempio). Per ottenere una concentrazione adeguata della soluzione madre si possono utilizzare colonne di saturazione (colonne di solubilità) o metodi di dosaggio passivo (6). Non si raccomanda l'uso di un solvente, ma se fosse necessario, si allestisce in parallelo un controllo con la stessa concentrazione di solvente utilizzata nelle vasche di esposizione alla sostanza chimica in esame; è preferibile che il livello di solvente sia lo stesso in tutte le vasche di esposizione e nelle vasche di controllo del solvente. Nei sistemi di diluizione in cui ciò è tecnicamente difficile, la concentrazione di solvente nelle

▼M7

vasche di controllo del solvente deve essere pari alla concentrazione di solvente più alta nelle vasche di esposizione. Per le sostanze difficili da saggiare, si consulti il documento d'orientamento dell'OCSE n. 23 sulle prove di tossicità in ambiente acquatico di sostanze o miscele difficili (2). La scelta del solvente eventualmente utilizzato dipende dalle proprietà chimiche della sostanza. Il documento di orientamento dell'OCSE n. 23 raccomanda di non superare una concentrazione di 100µl/l. Per evitare che il solvente possa influire sugli endpoint misurati (7) si raccomanda che la concentrazione di solvente sia la più bassa possibile.

17. Nelle prove semistatiche si possono seguire due diverse procedure di rinnovo del mezzo: o si preparano nuove soluzioni di prova in vasche pulite e si trasferiscono delicatamente le uova e le larve sopravvissute nelle nuove vasche, o si mantengono gli organismi sperimentali nelle vasche di prova e si rinnova una parte (almeno due terzi) della soluzione di prova / di controllo.

PROCEDURA

Condizioni di esposizione

Durata

18. La prova inizia il più rapidamente possibile dopo la fecondazione delle uova, di preferenza immergendole nelle soluzioni di prova prima che inizi la segmentazione della discoblastula, o il prima possibile dopo questo stadio. La durata della prova dipende dalla specie utilizzata. Alcune indicazioni in proposito sono riportate nell'appendice 2.

Carico

19. Il numero di uova fecondate all'inizio della prova deve essere sufficiente a soddisfare i criteri statistici. Le uova sono distribuite in modo casuale nei diversi gruppi esposti; il numero minimo di uova per livello di concentrazione è 80, suddivise in parti uguali tra almeno quattro repliche. Il tasso di carico (biomassa per volume di soluzione di prova) deve essere sufficientemente basso da mantenere la concentrazione dell'ossigeno disciolto ad almeno il 60 % del valore di saturazione nell'aria, senza necessità di aerazione, durante lo stadio embrionale e quello larvale. Per le prove a flusso continuo si raccomanda un tasso di carico non superiore a 0,5 g/l (peso umido) su 24 ore e comunque mai superiore a 5 g/l di soluzione (3).

Illuminazione e temperatura

20. Il fotoperiodo e la temperatura dell'acqua devono essere adatti alla specie utilizzata (cfr. appendice 2).

Alimentazione

21. Il regime alimentare è un aspetto determinante ed è quindi indispensabile fornire il cibo adatto a ogni stadio di sviluppo, a partire dal momento giusto e in quantità sufficiente ad assicurare una crescita normale. L'alimentazione deve essere pressoché uguale in tutte le repliche, salvo modifiche per tener conto della mortalità. Per evitare l'accumulo di rifiuti il cibo non consumato e gli escrementi sono eliminati, quando necessario. Alcuni esempi di regime alimentare sono illustrati nell'appendice 3, ma si punta a perfezionare continuamente il regime alimentare sulla base dell'esperienza acquisita in modo da innalzare il tasso di sopravvivenza e ottimizzare la crescita. Il cibo vivo arricchisce l'ambiente e pertanto deve sostituire o integrare il cibo disidratato o congelato, purché sia adatto alla specie e allo stadio di sviluppo.

Concentrazioni di prova

22. Si utilizzano normalmente cinque concentrazioni della sostanza chimica in esame, intervallate secondo un fattore costante non superiore a 3,2, con almeno quattro repliche per concentrazione. Per determinare la serie delle concentrazioni da saggiare si tiene conto dei dati eventualmente disponibili provenienti da prove di tossicità acuta, di preferenza sulla stessa specie, e/o si effettua un saggio preliminare (1). Tuttavia, nella scelta della serie delle concentrazioni di prova occorre tenere conto di tutte le fonti di informazioni, in particolare i dati del read-across, i dati ricavati da prove di tossicità acuta su embrioni di pesci ecc. Se s'intendono stabilire solo valori NOEC empirici è accettabile, come prova definitiva, una prova limite, o una prova limite

▼M7

estesa, con meno di cinque concentrazioni. L'uso di un numero di concentrazioni inferiore a cinque va giustificato. Non è necessario saggiare concentrazioni della sostanza chimica in esame superiori all'LC_{50} dopo 96 ore, o a 10 mg/l se l'LC_{50} è superiore a questa concentrazione.

Controlli

23. Oltre alla serie di concentrazioni della sostanza chimica in esame, si deve allestire una prova di controllo dell'acqua di diluizione e, se necessario, una prova di controllo del solvente utilizzato (cfr. paragrafo 16).

Frequenza delle misurazioni e delle determinazioni analitiche

24. Prima di avviare l'esposizione si verifica il buon funzionamento del sistema di erogazione della sostanza chimica in esame in tutte le repliche (ad esempio, misurando le concentrazioni di prova). I metodi analitici necessari devono essere chiaramente definiti, tra cui un limite di quantificazione (LOQ) adeguato e una conoscenza sufficiente della stabilità della sostanza nel sistema sperimentale. Durante la prova si determinano le concentrazioni della sostanza chimica in esame a intervalli regolari per caratterizzare l'esposizione. Si eseguono almeno cinque determinazioni. Se si utilizza un sistema a flusso continuo si effettua, almeno una volta alla settimana, la misurazione analitica della sostanza chimica in esame in una replica per ciascuna concentrazione, scegliendo ogni volta repliche diverse. La qualità dei risultati spesso migliora quando si effettuano determinazioni analitiche supplementari. Affinché le determinazioni della sostanza chimica siano eseguite in soluzione vera, può essere necessario filtrare i campioni per eliminare eventuali particelle (con filtri di porosità pari a 0,45 μm, ad esempio), o centrifugarli. Per ridurre l'adsorbimento della sostanza chimica di prova, i filtri devono essere saturati prima dell'uso. Se le concentrazioni misurate non rientrano nell'intervallo 80-120 % della concentrazione nominale, le concentrazioni con effetto devono essere determinate ed espresse come segue:, nelle prove a flusso continuo, in rapporto alla media aritmetica delle concentrazioni (per il calcolo della media aritmetica cfr. appendice 6 del metodo di prova C.20 (8)); nelle prove semistatiche, in rapporto alla media geometrica delle concentrazioni misurate (cfr. capitolo 5 del documento di orientamento dell'OCSE sulle prove di tossicità in ambiente acquatico di sostanze o miscele difficili (2)).

25. Durante la prova si misurano, almeno una volta alla settimana, l'ossigeno disciolto, il pH e la temperatura in tutte le vasche di prova; se necessario si misurano la salinità e la durezza dell'acqua all'inizio e alla fine della prova. Di preferenza, si controlla costantemente la temperatura almeno in una vasca di prova.

Osservazioni

26. **Stadio embrionale**: verificare il più accuratamente possibile lo stadio embrionale all'inizio dell'esposizione alla sostanza chimica in esame. A tal fine si può utilizzare un campione rappresentativo di uova adeguatamente conservate e pulite.

27. **Schiusa e sopravvivenza**: l'osservazione della schiusa e della sopravvivenza si esegue almeno una volta al giorno e se ne registrano i numeri. Si contano e si scartano le uova che all'inizio della fase di sviluppo embrionale (il primo o il secondo giorno di prova, ad esempio) presentano muffe. Gli embrioni, le larve e gli individui giovani morti vanno rimossi non appena individuati in quanto possono decomporsi rapidamente ed essere fatti a pezzi dagli altri pesci. Nel rimuovere gli individui morti occorre fare estrema attenzione a non danneggiare le uova/larve adiacenti. I segni di decesso dipendono dalla specie e dallo stadio di vita. Ad esempio:

▼M7

— uova fecondate: soprattutto nei primi stadi, netta perdita di traslucidità e cambiamento della colorazione dovute a coagulazione e/o precipitazione di proteine, con conseguente aspetto bianco opaco;

— embrioni, larve e pesci giovani: immobilità e/o assenza di movimenti opercolari e/o assenza di battito cardiaco e/o assenza di reazione agli stimoli meccanici.

28. **Aspetto anomalo**: con una frequenza congrua alla durata della prova e alla natura dell'anomalia, si registra il numero di larve o pesci giovani che presentano anomalie morfologiche. La presenza di larve e pesci giovani anomali è un fenomeno naturale che, per alcune specie, può essere dell'ordine di svariati punti percentuali nel/i controllo/i. Se le malformazioni e i comportamenti anomali associati sono considerati gravi al punto da causare grandi e irreversibili sofferenze, l'organismo colpito può essere ritirato dalla prova. Gli animali in queste condizioni sono soppressi in modo incruento e considerati casi di mortalità nella successiva analisi dei dati. Uno sviluppo embrionale normale per la maggior parte delle specie raccomandate nel presente metodo di prova è descritto in letteratura (9) (10) (11) (12).

29. **Comportamento anomalo**: con una frequenza congrua alla durata della prova (ad esempio, una volta al giorno per le specie tropicali) si registrano le anomalie osservate, quali iperventilazione, nuoto scoordinato, immobilità o comportamento alimentare atipici. L'eventuale osservazione di tali effetti, per quanto difficili da quantificare, può facilitare l'interpretazione dei dati sulla mortalità.

30. **Peso**: alla fine della prova si pesano i pesci sopravvissuti, almeno per replica (registrando il numero di pesci presenti nella replica e il peso medio per pesce); è preferibile utilizzare il peso umido (previa asciugatura su carta assorbente), ma si può anche indicare nella relazione il peso secco (13).

31. **Lunghezza**: alla fine della prova si misura ogni pesce. Si raccomanda di misurarne la lunghezza totale, ma in caso di marcescenza della pinna caudale o erosione delle pinne è possibile utilizzare la lunghezza standard. Si applica lo stesso metodo per tutti i pesci utilizzati nella prova. I pesci possono essere misurati, ad esempio, con un calibro, una macchina fotografica digitale, o un micrometro oculare graduato. Le lunghezze minime tipiche sono indicate nell'appendice 2.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

32. Se si deve determinare la NOEC, si raccomanda che il disegno sperimentale e la prova statistica prescelta abbiano una potenza tale (almeno 80 %) da consentire di individuare i cambiamenti d'importanza biologica negli endpoint. Le pertinenti concentrazioni con effetto e i parametri da riportare nella relazione possono dipendere dal quadro normativo. Se si deve determinare un'EC_x, il disegno sperimentale e il modello di regressione prescelto devono permettere di stimare questa concentrazione in modo che i) l'intervallo di confidenza del 95 % per l'EC_x non contenga il valore zero e non sia troppo ampio, ii) l'intervallo di confidenza del 95 % per la media prevista alla concentrazione EC_x non contenga la media del controllo, e iii) il modello di regressione non presenti una mancanza di adattamento (*lack-of-fit*) significativa ai dati. In entrambi i casi occorre precisare la variazione percentuale di ogni endpoint che s'intende rilevare o stimare. Il disegno sperimentale dovrebbe essere concepito in modo da permettere ciò. Quando le

▼M7

predette condizioni per determinare l'EC_x non sono soddisfatte, si utilizza l'approccio basato sulla NOEC. Poiché è improbabile che la stessa variazione percentuale si verifichi in tutti gli endpoint, così come che si possa concepire un'esperienza fattibile che soddisfi i suddetti criteri per tutti gli endpoint, è necessario che il disegno sperimentale sia concepito in modo da concentrarsi sugli endpoint che sono importanti per l'esperienza. Le appendici 5 e 6 contengono diagrammi di analisi statistica e orientamenti per entrambi gli approcci per guidare il trattamento dei dati e la scelta della prova o del modello statistico più adatti. È possibile impiegare altri approcci statistici, purché siano scientificamente giustificati.

33. È necessario analizzare le variazioni all'interno di ogni serie di repliche effettuando un'analisi della varianza o avvalendosi di tabelle di contingenza e utilizzare metodi adeguati di analisi statistica fondati su questa analisi. Per effettuare un confronto multiplo fra i risultati ottenuti per ogni concentrazione e quelli ottenuti per il controllo, si raccomandano i test di Jonckheere-Terpstra o di Williams, nel caso delle risposte continue, e il test regressivo di Cochran-Armitage, nel caso delle risposte quantali compatibili con una relazione concentrazione-risposta monotona e senza indizi di varianza extrabinomiale (14). In caso vi siano indizi di varianza extrabinomiale, si raccomandano il test di Cochran-Armitage (15) (16) modificato da Rao-Scott, i test di Williams o Dunnett (dopo trasformazione arcoseno della radice quadrata), o di Jonckheere-Terpstra, applicati alle proporzioni relative a ogni replica. Se i dati non sono compatibili con una relazione monotona concentrazione-risposta può essere utile ricorrere ai test di Dunnett, di Dunn o di Mann-Whitney, in caso di risposte continue, e al test esatto di Fisher in caso di risposte quantali (14) (17) (18). Quando si applica un metodo o un modello statistico occorre assicurarsi che i requisiti del metodo o del modello siano soddisfatti (ad esempio, la variabilità da una vasca all'altra è stimata e presa in considerazione nel disegno sperimentale o nel modello o test statistico utilizzato) Si valuta il grado di normalità dei dati; l'appendice 5 indica il trattamento da riservare ai residui di un'ANOVA. L'appendice 6 contiene ulteriori considerazioni sulla regressione. Occorre vagliare l'opportunità di trasformazioni per soddisfare i requisiti del test statistico. Le trasformazioni intese ad adattare un modello di regressione richiedono tuttavia, grande prudenza, dal momento che, ad esempio, una variazione del 25 % della risposta non trasformata non corrisponde a una variazione del 25 % della risposta trasformata. In tutte le analisi è la vasca di prova, e non il pesce, che costituisce l'unità di analisi e l'unità sperimentale, elemento che deve trovare riscontro sia nei test di ipotesi sia nella regressione (3) (14) (19) (20).

Relazione sulla prova

34. I dati descritti in appresso devono figurare nella relazione di prova.

Sostanza chimica in esame

Sostanza monocostituente:

— aspetto fisico, idrosolubilità e altre proprietà fisico-chimiche pertinenti;

— identificazione chimica, come denominazione IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale, purezza, identità chimica delle impurità, se opportuno e fattibile, ecc. (compreso il tenore di carbonio organico, se del caso).

Sostanza multicostituente, sostanze UVCB e miscele:

— caratterizzazione, per quanto possibile, mediante, ad esempio, l'identità chimica dei costituenti (vedi sopra), loro presenza quantitativa e loro proprietà fisico-chimiche pertinenti.

Specie sperimentali:

— nome scientifico, ceppo, origine e metodo di raccolta delle uova fecondate e successiva manipolazione.

▼M7

Condizioni sperimentali:

— procedura sperimentale utilizzata (statica, semistatica o a flusso continuo);

— fotoperiodo/i;

— disegno sperimentale (ad esempio, numero di vasche di prova e repliche, numero di uova per replica, materiale e dimensioni della vasca di prova — altezza, larghezza, volume -, volume d'acqua per vasca di prova;

— metodo di preparazione delle soluzioni madre e frequenza di rinnovo (indicare l'agente solubilizzante, se usato, e la sua concentrazione);

— metodo di dosaggio della sostanza chimica in esame (ad esempio pompe dosatrici, sistemi di diluizione);

— efficienza di recupero del metodo e concentrazioni nominali di prova, limite di quantificazione, medie dei valori misurati, rispettive deviazioni standard nelle vasche di prova, metodo con cui tali deviazioni e medie sono state ottenute così come dati comprovanti che le misurazioni corrispondono alle concentrazioni della sostanza chimica in esame in soluzione vera;

— caratteristiche dell'acqua di diluizione: pH, durezza, temperatura, concentrazione dell'ossigeno disciolto, livelli di cloro residuo (se misurati), carbonio organico totale (idem), solidi in sospensione (idem), salinità del mezzo di prova (idem) e altre eventuali misurazioni eseguite;

— qualità dell'acqua nelle vasche di prova, pH, durezza, temperatura e concentrazione dell'ossigeno disciolto;

— informazioni dettagliate sull'alimentazione (ad esempio tipo di cibo, origine, quantità somministrata e frequenza).

Risultati riportati individualmente (o per replica), sotto forma di media e di coefficiente di variazione, se del caso, per i seguenti endpoint:

— prova che il controllo soddisfa i criteri di accettabilità stabiliti per la sopravvivenza globale della specie in esame (appendice 2);

— dati sulla mortalità in ciascuno stadio (embrionale, larvale e giovanile) e mortalità cumulativa;

— giorni trascorsi fino alla schiusa, numero giornaliero di uova schiuse e fine della schiusa;

— numero di pesci sani alla fine della prova.

— dati relativi alla lunghezza (specificare se lunghezza standard o totale) e al peso degli animali sopravvissuti;

— incidenza, descrizione e numero delle eventuali anomalie morfologiche;

— incidenza, descrizione e numero delle eventuali anomalie comportamentali;

— approccio seguito per l'analisi statistica (analisi di regressione o analisi della varianza) e per il trattamento dei dati (test o modello statistico utilizzato);

— concentrazione senza effetti osservati (NOEC) per ogni risposta studiata;

▼M7

— concentrazione minima alla quale si osserva un effetto (LOEC) (a p = 0,05) per ogni risposta studiata;

— EC_x per ogni risposta studiata, se del caso, e intervalli di confidenza (90 % o 95 %, per esempio), grafico del modello adattato utilizzato per calcolarla, pendenza della curva concentrazione-risposta, formula del modello di regressione, stima dei parametri del modello e dei rispettivi errori tipo.

Deviazioni rispetto al metodo di prova.

Discussione dei risultati, compresa qualsiasi influenza delle deviazioni dal metodo di prova sui risultati della prova.

Tabella 1

Specie di pesci raccomandate per la prova

DI ACQUA DOLCE	ESTUARINE e MARINE
Oncorhynchus mykiss Trota iridea	*Cyprinodon variegatus*
Pimephales promelas	Menidia sp. Latterino
Danio rerio Danio zebrato	
Oryzias latipes Pesce del riso o Medaka	

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.171, OECD, Paris.

(2) OECD (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23, OECD Paris.

(3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88. 26 pp.

(4) Brauhn, J.L. and R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(5) Brungs, W.A. and B.R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(6) Adolfsson-Erici, *et al*. (2012), A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests, Chemosphere 86, 593-599.

(7) Hutchinson, T.H. *et al*. (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69-92.

(8) Capitolo C.20 del presente allegato, Prova di riproduzione con *Daphnia magna*.

(9) Hansen, D.J. and P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (*Cyprindon variegatus*) for life-cycle toxicity tests, In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.

(10) Kimmel, H. B.*et al*. (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203:253–310.

▼M7

(11) Gonzalez-Doncel, M. *et al* (2005), A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthydae) Journal of Applied Ichthyology, 20:1–14.

(12) Devlin, E.W. *et al*. (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, *Pimephales promelas* Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C..

(13) Oris, J.T., S.C. Belanger, and A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, Environmental Toxicology and Chemistry 31; 2, 370 — 376.

(14) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.

(15) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

(16) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

(17) Dunnett C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of Ameican Statistical Association, 50, 1096-1121.

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

(19) Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (1985), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.

(20) McClave, J.T., J.H. Sullivan and J.G. Pearson (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼M7

Appendice 1

DEFINIZIONI

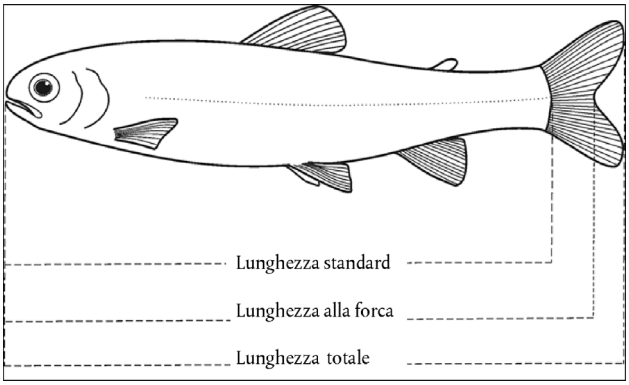
Lunghezza alla forca (FL): lunghezza dall'apice del muso e all'estremità dei raggi centrali della pinna caudale; è utilizzata per i pesci in cui è difficile determinare la fine della colonna vertebrale (www.fishbase.org).

Lunghezza standard (SL): lunghezza del pesce misurata tra l'apice del muso e l'estremità posteriore dell'ultima vertebra o l'estremità posteriore della parte laterale media della piastra ipurale. In altre parole, questa misurazione non tiene conto della lunghezza della pinna caudale. (www.fishbase.org).

Lunghezza totale (TL): lunghezza dall'apice del muso all'estremità del lobo più lungo della pinna caudale, generalmente misurata con i lobi appiattiti nel prolungamento della linea mediana. La misurazione si effettua in linea retta, senza seguire la curva del corpo (www.fishbase.org).

Figura 1

Descrizione delle varie lunghezze utilizzate



Sostanza chimica: sostanza o miscela.

EC_x: (concentrazione con effetto nel x %): la concentrazione che provoca un effetto nel x % degli organismi di prova durante un determinato periodo di esposizione rispetto al controllo. Ad esempio, EC_{50} è la concentrazione che si ritiene produca un effetto su un endpoint in esame nel 50 % della popolazione esposta durante il periodo di esposizione definito.

Concentrazione minima alla quale si osserva un effetto (LOEC — *Lowest Observed Effect Concentration*): concentrazione più bassa saggiata della sostanza chimica in esame alla quale si osserva un effetto significativo ($p < 0,05$) rispetto al controllo. Tutte le concentrazioni di prova superiori alla LOEC devono tuttavia avere un effetto dannoso uguale o superiore a quello osservato per la LOEC. Se queste due condizioni non sono soddisfatte occorre spiegare come è stata scelta la LOEC (e la NOEC). Le appendici 5 e 6 forniscono orientamenti al riguardo.

Concentrazione senza effetti osservati (NOEC): concentrazione di prova immediatamente inferiore alla LOEC, alla quale non vengono osservati effetti statisticamente significativi ($p < 0,05$) rispetto al controllo durante il periodo di esposizione definito.

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

UVCB: sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici.

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry* — Unione internazionale di chimica pura e applicata.

SMILES: *Simplified Molecular Input Line Entry Specification* (notazione semplificata lineare delle molecole).

▼M7

Appendice 2

CONDIZIONI SPERIMENTALI, DURATA E CRITERI DI SOPRAVVIVENZA PER LE SPECIE RACCOMANDATE

SPECIE	CONDIZIONI SPERIMENTALI			DURATA RACCOMANDATA DELLA PROVA	Valore medio minimo tipico della lunghezza totale dei controlli alla fine dello studio (mm) (1)	SOPRAVVIVENZA DEI CONTROLLI (minima)	
	Temperatura (°C)	Salinità ($^0/_{00}$)	Fotoperiodo (ore)			Alla schiusa	Dopo la schiusa
Di acqua dolce							
Oncorhynchus mykiss Trota iridea	10 ± 1,5 (2)		12 — 16 (3)	2 settimane dopo che i pesci del controllo iniziano ad assumere cibo (o 60 giorni a decorrere dalla schiusa)	40	75 %	75 %
Pimephales promelas	25 ± 1,5		16	32 giorni a decorrere dall'inizio della prova (o 28 giorni dalla schiusa)	18	70 %	75 %
Danio rerio Danio zebrato	26 ± 1,5		12 — 16 (4)	30 giorni a decorrere dalla schiusa	11	70 %	75 %
Oryzias latipes Pesce del riso o Medaka	25 ± 2		12 — 16 (4)	30 giorni a decorrere dalla schiusa	17	80 %	80 %
Estuarine e marine							
Cyprinodon variegatus	25 ± 1,5	15-35 (5)	12 — 16 (4)	32 giorni a decorrere dall'inizio della prova (o 28 giorni dalla schiusa)	17	75 %	80 %
Menidia sp. Latterino	22 — 25	15-35 (5)	13	28 giorni	20	80 %	60 %

Legenda:

(1) Il valore medio minimo tipico della lunghezza totale non è un criterio di validità ma le medie inferiori al valore indicato devono essere esaminate attentamente per valutare la sensibilità della prova. I valori medi minimi della lunghezza totale sono determinati sulla base di una selezione dei dati disponibili.

(2) Il particolare ceppo di trota iridea studiato può richiedere l'uso di altre temperature. I pesci riproduttori devono essere mantenuti alla stessa temperatura delle uova. Le uova che provengono da un fornitore commerciale richiedono un breve periodo d'adattamento (1-2 ore) alla temperatura alla quale si svolgerà la prova.

(3) Durante la settimana successiva alla schiusa le larve sono tenute al buio, tranne quando sono esaminate; per tutto il resto della prova si mantiene un'illuminazione fioca (fotoperiodo compreso tra 12 e 16 ore) (4).

(4) Indipendentemente dalle condizioni sperimentali, l'illuminazione prescelta deve essere costante.

(5) La deviazione ammessa in tutte le prove è di ± $2^0/_{00}$.

▼M7

Appendice 3

ORIENTAMENTI PER L'ALIMENTAZIONE E LA MANIPOLAZIONE DEI PESCI RIPRODUTTORI E DEI PESCI UTILIZZATI NELLE PROVE, DELLE SPECIE RACCOMANDATE

SPECIE	CIBO (*)				MOMENTO DEL TRASFERIMENTO DOPO LA SCHIUSA	MOMENTO DELLA PRIMA SOMMINISTRAZIONE DI CIBO
	Pesci riproduttori	Larve appena schiuse	Pesci giovani			
			Tipo	Frequenza		
Di acqua dolce						
Oncorhynchus mykiss Trota iridea	Mangime per trote	Nessuno ([a])	Mangime di svezzamento per trote NA	2-4 volte al giorno	14-16 giorni dopo la schiusa o all'affioramento (facoltativo)	19 giorni dopo la schiusa o all'affioramento
Pimephales promelas	NA, fiocchi, AC	NA	NA48, fiocchi	2-3 volte al giorno	A partire dal 90 % di schiusa	2 giorni dopo la schiusa
Danio rerio Danio zebrato	NA, fiocchi	Mangime per larve disponibile in commercio, protozoi ([b]), proteine ([c])	NA48, fiocchi	NA una volta al giorno; fiocchi due volte al giorno	A partire dal 90 % di schiusa	2 giorni dopo la schiusa
Oryzias latipes Pesce del riso o Medaka	Fiocchi	NA, fiocchi (oppure protozoi o rotiferi)	NA48, fiocchi (o rotiferi)	NA una volta al giorno; fiocchi due volte al giorno o fiocchi e rotiferi una volta al giorno	Non pertinente	6-7 giorni dopo la deposizione delle uova
Estuarine e marine						
Cyprinodon variegatus	NA, fiocchi AC	NA	NA48	2-3 volte al giorno	Non pertinente	1 giorno dopo la schiusa/affioramento
Menidia sp. Latterino	NA48, fiocchi	NA	NA48	2-3 volte al giorno	non pertinente	1 giorno dopo la schiusa/affioramento

Legenda

(*) Cibo fornito ad libitum. Per evitare l'accumulo di rifiuti il cibo non consumato e gli escrementi sono eliminati, quando necessario.

AC = artemie congelate; adulti di *Artemia* sp

NA = naupli di artemia; appena schiusi

NA48 = naupli di artemia; di 48 ore di età

([a]) le larve provviste di sacco vitellino non hanno bisogno di essere alimentate

([b]) filtrati da coltura mista

([c]) granuli da processo di fermentazione

02008R0440 — IT — 08.01.2026 — 011.001 — 1514

▼M7

Appendice 4

ALCUNE CARATTERISTICHE CHIMICHE DI UN'ACQUA DI DILUIZIONE ACCETTABILE

Componente	Concentrazione limite
Particolato	5 mg/l
Carbonio organico totale	2 mg/l
Ammoniaca non ionizzata	1 µg/l
Cloro residuo	10 µg/l
Pesticidi organofosforati totali	50 ng/l
Somma dei pesticidi organoclorurati e dei difenili policlorurati, totali	50 ng/l
Cloro organico totale	25 ng/l
Alluminio	1 µg/l
Arsenico	1 µg/l
Cromo	1 µg/l
Cobalto	1 µg/l
Rame	1 µg/l
Ferro	1 µg/l
Piombo	1 µg/l
Nichel	1 µg/l
Zinco	1 µg/l
Cadmio	100 ng/l
Mercurio	100 ng/l
Argento	100 ng/l

▼M7

Appendice 5

ORIENTAMENTI PER L'ANALISI STATISTICA CON CUI DETERMINARE LA NOEC

Orientamenti generali

Ogni replica costituisce un'unità di analisi. Pertanto, nel caso delle misurazioni continue, come le dimensioni, si calcola la media o la mediana di ogni replica e i valori ottenuti costituiscono i dati da analizzare. Occorre dimostrare la potenza dei test utilizzati, di preferenza facendo riferimento a una base adeguata di dati storici del laboratorio. Per ogni endpoint si indica il test statistico da utilizzare e la variazione (minima) delle dimensioni dei pesci rilevabile con una potenza statistica del 75-80 %.

Le basi di dati disponibili al momento dell'elaborazione del presente metodo di prova definiscono la potenza ottenibile con i metodi statistici raccomandati. Il laboratorio deve dimostrarsi in grado di soddisfare il requisito della potenza effettuando un'analisi della potenza o dimostrando che il coefficiente di variazione (CV) di ogni risposta non supera il 90^{o} percentile dei coefficienti di variazione utilizzati per elaborare il metodo di prova, indicati nella tabella 1. Se si dispone unicamente delle medie e delle mediane delle repliche, il coefficiente di variazione intra repliche può essere ignorato.

Tabella 1

90° percentile dei coefficienti di variazione per le specie d'acqua dolce selezionate

Specie	Risposta	CV_inter repliche	CV_intra repliche
Trota iridea	Lunghezza	17,4	9,8
	Peso	10,1	28
Pimephales promelas	Lunghezza	16,9	13,5
	Peso	11,7	38,7
Danio zebrato	Lunghezza	43,7	11,7
	Peso	11,9	32,8

Per quasi tutti i test statistici utilizzati per valutare gli studi tossicologici condotti in laboratorio, i confronti di interesse riguardano i gruppi esposti rispetto al controllo. Non è, pertanto, giustificato esigere un test F ANOVA statisticamente significativo prima di utilizzare il test di Dunnett o il test di Williams, né un test statisticamente significativo di Kruskal-Wallis prima di realizzare il test di Jonckheere-Terpstra, di Mann-Whitney, o di Dunn (Hochberg e Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al*. 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Il test di Dunnett consente confronti multipli e l'uso di un test F come filtro ne pregiudica i tassi di falsi positivi e falsi negativi. Analogamente, i test regressivi di Williams e di Jonckheere-Terpstra con un livello di significatività di 0,05 in ogni fase mantengono un tasso complessivo di falsi positivi del 5 % e questo tasso, così come la potenza dei test, sono pregiudicati dall'utilizzo del test F o del test di Kruskal-Wallis come filtro. Il test di Mann-Whitney e il test di Dunn devono essere corretti ai fini dei confronti multipli, e si consiglia la correzione di Bonferroni-Holm.

In OCSE (2006) si trova un'ampia bibliografia e un'analisi approfondita della maggior parte delle raccomandazioni sui test di ipotesi e sulla verifica dei presupposti sottostanti.

▼M7

Trattamento dei controlli quando si utilizza un solvente

Se si utilizza un solvente è necessario prevedere un controllo dell'acqua di diluizione e un controllo del solvente. Si confronta la risposta ottenuta per il primo con la risposta ottenuta per il secondo e, se non presentano differenze statisticamente significative, i due controlli vengono combinati nell'analisi statistica. In caso contrario, si utilizza il controllo del solvente per determinare la NOEC o per stimare l'$EC_{x,}$ ma non il controllo dell'acqua di diluizione. Si veda la restrizione enunciata nei criteri di validità (paragrafo 7).

Per quanto riguarda la lunghezza, il peso, la proporzione di uova schiuse, larve morte o larve anomale e il primo o l'ultimo giorno della schiusa o dell'affioramento, si utilizza un test T o un test di Mann-Whitney per confrontare il controllo dell'acqua di diluizione e il controllo del solvente al livello di significatività dello 0,05, ignorando tutti i gruppi esposti. I risultati di questi test devono figurare nella relazione.

Misurazioni morfologiche (lunghezza e peso)

La lunghezza e il peso dei pesci possono seguire una distribuzione normale o log normale. In entrambi i casi i valori medi per replica tendono a una distribuzione normale, come previsto dal teorema del limite centrale e corroborato dai risultati di oltre un centinaio di studi condotti nei primi stadi di vita di tre specie di acqua dolce. In alternativa, se i dati o le basi di dati storici indicano una distribuzione log normale dei valori relativi alle dimensioni dei pesci, si può calcolare il logaritmo della media dei valori corrispondenti ai pesci che formano ogni replica e i dati da analizzare saranno gli antilogaritmi di tali logaritmi di medie per replica.

Si valuta la compatibilità dei dati con una distribuzione normale e con una varianza omogenea. A tal fine, si utilizzano i residui di un modello ANOVA in cui la concentrazione sia l'unica variabile esplicativa. Si può ricorrere a rappresentazioni sotto forma di grafico a dispersione, istogrammi e grafici a ramo e foglia; oppure si può utilizzare un test formale, come il test di Shapiro-Wilk o il test di Anderson-Darling. La compatibilità con una varianza omogenea può essere valutata tramite un esame visivo dello stesso grafico a dispersione o, formalmente, per mezzo del test di Levene. La verifica della normalità e dell'omogeneità della varianza è necessaria solo per i test parametrici (per esempio, Williams o Dunnett).

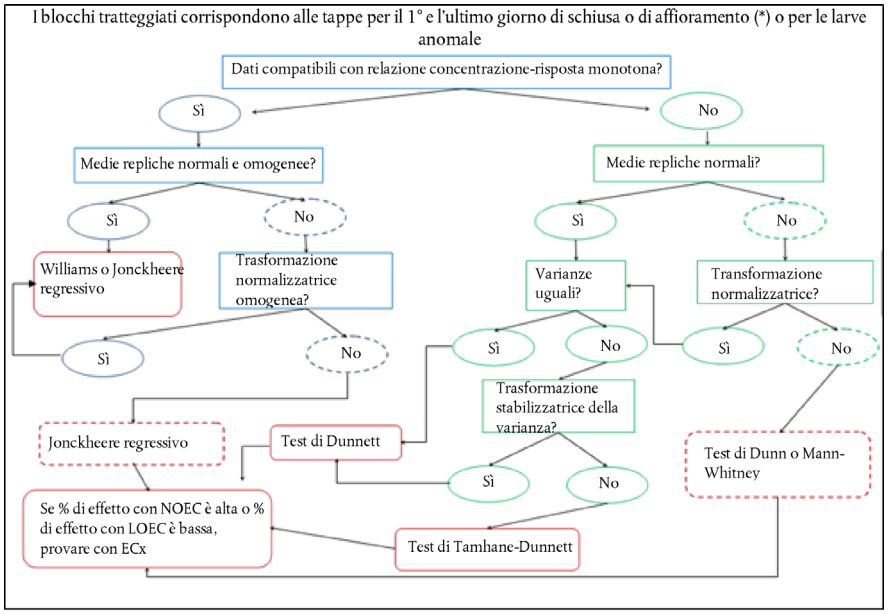
Occorre prestare attenzione a eventuali valori anomali e alle conseguenti implicazioni sull'analisi. È possibile ricorrere al test dei valori anomali di Tukey e all'esame visivo dei summenzionati grafici dei residui. Si rammenta che l'osservazione corrisponde alla replica intera, pertanto l'esclusione di valori anomali dall'analisi necessita attenta ponderazione.

I test statistici che si basano sulle caratteristiche del disegno sperimentale e sulle aspettative biologiche sono test di tendenza regressivi, come il test di Williams e il test di Jonckheere-Terpstra. Questi test presuppongono una relazione concentrazione-risposta monotona, per cui occorre valutare la compatibilità dei dati con tale presupposto; la valutazione può essere effettuata visivamente osservando il grafico a dispersione delle medie per replica in funzione della concentrazione di prova. Sarà utile sovrapporre al grafico a dispersione un grafico lineare a tratti che colleghi le concentrazioni medie ponderate per la dimensione del campione della replica; un diagramma lineare che si discosta molto da un tracciato monotono può indicare la necessità di applicare test non parametrici. In alternativa si possono utilizzare test formali. Un test formale semplice consiste nel calcolare i contrasti lineari e quadratici delle medie della concentrazione: se il contrasto quadratico è significativo e il contrasto lineare non lo è, può esserci un problema di monotonia, da rivalutare sulla base dei suddetti grafici; se la normalità e l'omogeneità della varianza pongono dubbi, i suddetti contrasti possono essere costruiti a partire dalla trasformazione dei dati in ranghi. Si può ricorrere a metodi alternativi, come il test di monotonia di Bartholomew, che però aggiungono complessità.

▼M7

Figura 2

Diagramma per la determinazione della NOEC in base alle misurazioni morfologiche (lunghezza e peso)



(*) Queste risposte non soddisfano mai i presupposti di modelli o analisi parametrici

A meno che i dati non siano compatibili con i requisiti di questi test, si determina la NOEC per applicazione regressiva del test di Williams o del test di Jonckheere-Terpstra. In OCSE (2006) si trovano informazioni dettagliate sull'applicazione di questi metodi. Se i dati non sono compatibili con i requisiti di un test di tendenza regressivo, si può utilizzare il test di Dunnett o il test di Tamhane-Dunnett (T3), entrambi i quali permettono confronti multipli. Questi test presuppongono una distribuzione normale e, nel caso del test di Dunnett, omogeneità della varianza. Se queste condizioni non sono soddisfatte, si può ricorrere al test non parametrico di Dunn. OCSE (2006) fornisce maggiori informazioni su tutti questi test. La figura 2 illustra schematicamente come scegliere il test adatto.

Schiusa delle uova e sopravvivenza delle larve

I dati da analizzare sono la proporzione di uova che si schiudono o di larve che sopravvivono in ogni replica. Si valutano tali proporzioni in termini di varianza extrabinomiale, che è frequente ma non universale in questi due casi. Il diagramma nella figura 3 serve a orientare la scelta del test adatto, a corredo del testo esplicativo.

Due tipi di test sono normalmente utilizzati: il test C (α) di Tarone (Tarone, 1979), e i test Chi-quadrato, ciascuno applicato separatamente ad ogni concentrazione di prova. Se si osserva una varianza extrabinomiale, anche solo in una concentrazione di prova, occorre utilizzare metodi che la contemplino.

Formula 1

test C(α) di Tarone (Tarone 1979)

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{2\sum_{j=1}^{m} n_j(n_j-1)\right\}^{1/2}}$$

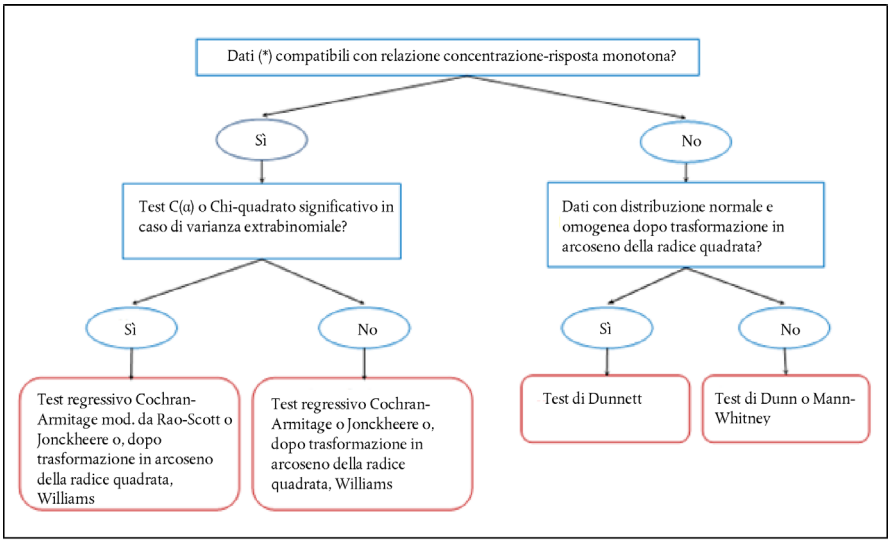
dove $\hat{p}$ è la proporzione media per una data concentrazione, **m** è il numero delle repliche (vasche), $\mathbf{n_j}$ è il numero degli individui presenti nella replica **j**, e $\mathbf{x_j}$ è il numero degli individui che rispondono in detta replica, ossia i casi di non schiusa

▼M7

o di decesso. Questo test si applica separatamente a ciascuna concentrazione. Può essere considerato un test Chi-quadrato corretto, ma nelle simulazioni di bassa potenza si è dimostrato più potente di un Chi-quadrato.

Figura 3

Diagramma per determinare la NOEC in base alla schiusa delle uova e dalla mortalità delle larve



(*) I dati da analizzare sono le proporzioni per replica.

Se non vi sono indizi significativi di varianza extrabinomiale, si può utilizzare il test regressivo di Cochran-Armitage; poiché questo test ignora le repliche, si raccomanda che, nel caso vi siano indizi significativi di varianza extrabinomiale, si applichi la correzione di Rao-Scott (RSCA), che tiene conto delle repliche, delle loro dimensioni e della varianza extrabinomiale. Altre possibilità sono i test regressivi di Williams e di Jonckheere-Terpstra, così come il test di Dunnett, illustrati nella sezione relativa alle misurazioni morfologiche. Questi test possono essere applicati indipendentemente dall'esistenza di varianza extrabinomiale, ma la loro potenza è minore (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao e Scott 1992, 1999, Fung *et al.* 1994, 1996).

Primo o ultimo giorno di schiusa o affioramento

La risposta da analizzare è un numero intero, che corrisponde al giorno della prova in cui l'osservazione indicata è effettuata in una determinata replica. L'intervallo di valori è generalmente molto limitato e sono frequenti proporzioni elevate di valori collegati, ad esempio, il primo giorno di schiusa è identico in tutte le repliche del controllo e, eventualmente, per la concentrazione più bassa o per le due concentrazioni più basse. I test parametrici, come quelli di Williams e Dunnett, non sono adatti all'analisi di tali dati. A meno che non vi siano indizi di netta non monotonia, il test regressivo di Jonckheere-Terpstra è molto potente nel rilevare gli effetti delle sostanze chimiche. In caso contrario si può utilizzare il test di Dunn.

Larve con anomalie

La risposta da analizzare è il numero di larve nelle quali è stata rilevata un'anomalia di qualsiasi genere. Questa risposta ha spesso un'incidenza bassa e presenta gli stessi problemi del primo giorno di schiusa, così come, talvolta, una relazione concentrazione-risposta talvolta erratica. Se dai dati si evince una funzione approssimativamente monotona della concentrazione, il test regressivo di Jonckheere-Terpstra è potente nel rilevamento degli effetti; in caso contrario si può utilizzare il test di Dunn.

▼**M7**

BIBLIOGRAFIA

Agresti, A. (2002); Categorical Data Analysis, second edition, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, J. American Statistical Association 50, 1096-1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, Technometrics 6, 241-252.

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

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, Risk Analysis 14, 639-648.

Fung, K.Y, D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, Canadian Journal of Statistics 24, 431-454.

Hochberg, Y. and A. C. Tamhane (1987); Multiple Comparison Procedures, Wiley, New York.

Hsu, J.C. (1996); Multiple Comparisons: Theory and Methods; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere A. R. (1954); A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, Biometrika 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

OECD (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, No. 54. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris..

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992) — A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1999) — A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright F.T. and Dykstra R.L. (1988); Order restricted statistical inference, Wiley.

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, Biometrika 66, 585-590.

Williams D.A. (1971); A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics 27, 103-117.

Williams D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28, 519-531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratotlogy, Biometrics 31, 949-952.

Williams D.A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, Biometrika 64, 9-14.

▼M7

Appendice 6

ORIENTAMENTI PER L'ANALISI STATISTICA DELLE STIME PER REGRESSIONE

Orientamenti generali

Le osservazioni alle quali adattare il modello sono le medie (della lunghezza e del peso) per replica o le proporzioni (della schiusa delle uova e della mortalità larvale) per replica (OCSE 2006).

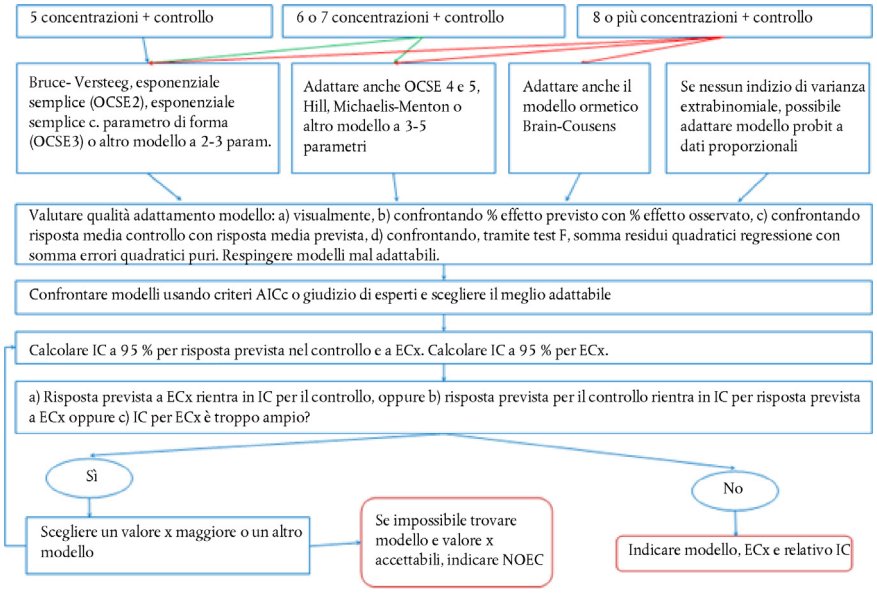
Si raccomanda, in generale, una regressione ponderata, utilizzando come fattore di ponderazione le dimensioni del campione della replica. Sono possibili altri metodi di ponderazione, ad esempio utilizzando come fattore di ponderazione la risposta media prevista o una combinazione di questa e delle dimensioni del campione della replica. Non si raccomanda la ponderazione per l'inverso della varianza dei campioni a ciascuna concentrazione (Bunke *et al.* 1999, Seber e Wild, 2003, Motulsky e Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

Qualsiasi trasformazione delle risposte prima dell'analisi deve mantenere l'indipendenza delle osservazioni; inoltre l'ECx e i limiti del relativo intervallo di confidenza devono essere espressi nelle unità di misura originali e non in unità trasformate. Per esempio, una variazione del 20 % del logaritmo della lunghezza non equivale a una variazione del 20 % della lunghezza (Lyles *et.al* 2008, Draper e Smith 1999).

Il diagramma della figura 4 schematizza il procedimento per la stima dell'ECx, a corredo della spiegazione dettagliata fornita nel testo.

Figura 4

Diagramma per la stima dell'ECx in funzione delle medie della lunghezza, del peso o della proporzione di schiusa delle uova o mortalità larvale per replica (per i dettagli si veda il testo)



Considerazioni sulla schiusa delle uova e sulla mortalità larvale

Per la schiusa delle uova e la mortalità larvale è in genere preferibile adattare un modello decrescente, a meno che non si intenda adattare un modello probit nel seguente modo: si adatta il modello alla proporzione di uova non schiuse o di larve morte; la ragione per cui si procede così è che l'EC_x si riferisce alla concentrazione alla quale si verifica una variazione dell'x % rispetto alla risposta media del controllo. Se il 5 % delle uova del controllo non si schiudono e il modello traduce la mancata schiusa, l'EC_{20} corrisponderà alla concentrazione alla quale si verifica una variazione del 20 % della proporzione del 5 % di uova non schiuse nel controllo, ossia una variazione pari a 0,2 x 0,05 = 0,01; si tratta di un

▼M7

aumento di 1 punto percentuale, che innalza al 6 % la proporzione di uova non schiuse. Una variazione così piccola non può essere stimata in modo significativo sulla base dei dati disponibili e non ha rilevanza biologica. Se invece il modello traduce la proporzione di uova schiuse, la proporzione corrispondente al controllo sarà, in questo esempio, del 95 % e una riduzione del 20 % rispetto alla media del controllo equivarrà a una variazione di 0,95 x 0,2 = 0,18, ossia una variazione della riuscita della schiusa dal 95 % al 77 % (= 95-18); la concentrazione che produce questo effetto può così essere stimata e presumibilmente è di maggiore interesse. Il problema non si pone con le misurazioni morfologiche, sebbene gli effetti negativi in tal caso corrispondano in genere a una diminuzione di peso o lunghezza.

Modelli applicabili alla morfologia (lunghezza o peso) e alla riuscita della schiusa o alla sopravvivenza larvale.

Ad eccezione del modello ormetico Brain-Cousens, tutti i seguenti modelli sono descritti e raccomandati in OCSE (2006). I modelli OCSE da 2 a 5 sono discussi per esperienze di ecotossicità anche in Slob (2002). Esistono, naturalmente, molti altri modelli che potrebbero essere utili: Bunke, *et al*. (1999) ne enumera una serie che non sono qui citati e abbondano i riferimenti ad altri. I modelli elencati di seguito, ampiamente utilizzati, sono considerati particolarmente adatti per esperienze di ecotossicità.

Con 5 concentrazioni della sostanza di prova più un controllo

— Modello di Bruce-Versteeg

— Modello esponenziale semplice (OCSE 2)

— Modello esponenziale con parametro di forma (OCSE 3)

— Modello esponenziale semplice con limite inferiore (OCSE 4)

Con 6 o più concentrazioni della sostanza di prova più un controllo

— Modello esponenziale con parametro di forma e limite inferiore (OCSE 5)

— Modello di Michaelis-Menten

— Modello di Hill

In presenza di ormesi comprovata visivamente (improbabile in caso di schiusa delle uova o di sopravvivenza larvale, ma talvolta registrata nelle osservazioni morfologiche)

— Modello ormetico Brain-Cousens; Brain e Cousens (1989).

Modelli alternativi per la mancata schiusa delle uova e la mortalità larvale

— In assenza di indizi di varianza extrabinomiale è possibile adattare a queste risposte modelli crescenti probit (o logistici), stimando l'incidenza nel controllo nell'adattamento del modello. Non è però questo il metodo da privilegiare, perché considera unità di analisi non la replica, ma l'individuo (Morgan 1992, O'Hara Hines e Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

Qualità dell'adattamento di un modello

— Confrontare visivamente la diminuzione percentuale, osservata e prevista, corrispondente a ogni concentrazione di prova (Motulsky e Christopoulos 2004, Draper e Smith 1999).

— Confrontare, mediante un test F, l'errore quadratico medio di regressione con l'errore quadratico medio puro (Draper e Smith 1999).

— Verificare che ogni termine del modello sia significativamente diverso da zero (vale a dire, determinare l'importanza di tutti i termini del modello) (Motulsky e Christopoulos 2004).

▼M7

— Rappresentare graficamente i residui della regressione in funzione della concentrazione di prova, ricorrendo eventualmente a una scala logaritmica della concentrazione. Questo grafico non deve definire alcun andamento; i punti sono distribuiti in modo casuale secondo una linea orizzontale all'altezza zero.

— Valutare la normalità della distribuzione e l'omogeneità della varianza dei dati, come indicato nell'appendice 5.

— Inoltre, valutare la normalità della distribuzione dei residui del modello di regressione, utilizzando gli stessi metodi indicati nell'appendice 5 per i residui di un modello ANOVA.

Confronto dei modelli

— Utilizzare i criteri AICc di Akiake. Valori AICc più piccoli traducono un migliore adattamento; se AICc(B)-AICc(A) ≥ 10, il modello A è quasi sicuramente migliore del modello B (Motulsky e Christopoulos, 2004).

— Confrontare i due modelli visivamente per vedere in che misura rispondono ai criteri sopraindicati per un modello.

— Si raccomanda di applicare il principio di parsimonia, secondo il quale occorre utilizzare il modello più semplice che si adatti ragionevolmente bene ai dati (Ratkowsky 1993, Lyles et.al 2008).

Qualità della stima dell'EC_x

L'intervallo di confidenza (IC) dell'EC_x non deve essere troppo ampio. Occorre vagliare statisticamente l'ampiezza massima che può avere l'intervallo di confidenza affinché l'EC_x sia utile. Dalle simulazioni dell'adattamento dei modelli di regressione ai dati della schiusa delle uova e ai dati morfologici emerge che l'ampiezza di circa il 75 % degli intervalli di confidenza dell'EC_x (x = 10, 20 o 30) non include più di due concentrazioni di prova. Questo dato fornisce un orientamento generale di quanto è accettabile e realizzabile. Molti autori sostengono che è necessario riportare nella relazione gli intervalli di confidenza di tutti i parametri del modello e che parametri con intervalli ampi sono indice d'inaccettabilità del modello (Ott e Longnecker 2008, Alvord e Rossio 1993, Motulsky e Christopoulos 2004, Lyles *et al.* 2008, Seber and Wild 2003, Bunke *et al.* 1999, Environment Canada 2005).

L'intervallo di confidenza corrispondente all'EC_x (o a qualsiasi altro parametro del modello) non deve includere il valore zero (Motulsky and Christopoulos 2004). Si tratta dell'equivalente, nella regressione, della differenza minima con significatività spesso citata negli approcci sperimentali basati sulla verifica delle ipotesi (ad esempio, Wang *et al* 2000). Corrisponde anche al fatto che l'intervallo di confidenza delle risposte medie alla LOEC non contiene la media del controllo. È importante riflettere sulla plausibilità scientifica delle stime dei parametri, ad esempio, se l'intervallo di confidenza corrispondente a y0 è ±20 % non sarà plausibile alcuna stima dell'EC_{10}. Se il modello prevede un effetto del 20 % alla concentrazione C e l'effetto massimo osservato a questa concentrazione e a concentrazioni inferiori è 10 %, l'EC_{20} non è plausibile (Motulsky e Christopoulos 2004, Wang *et al.* 2000, Environment Canada 2005).

L'EC_x non è estrapolabile al di fuori dell'intervallo delle concentrazioni positive (Draper and Smith 1999; OCSE, 2006). Ad esempio, un orientamento generale potrebbe essere che l'EC_x non sia inferiore di oltre il 25 % circa alla concentrazione più bassa saggiata, né superiore nella stessa misura a quella più alta.

BIBLIOGRAFIA

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, Journal of Immunological Methods 157, 155-163.

Brain P. and Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed res. 29: 93-96.

▼M7

Bunke, O., Droge, B. and Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.

Collett, D. (2002); Modelling Binary Data, second edition, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003); Modelling Survival Data in Medical Research, second edition, Chapman and Hall, London.

Draper, N.R. and Smith, H. (1999); Applied Regression Analysis, third edition. New York: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005); Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests, Report EPS 1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, and C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 2008 November; 29(6): 878–886.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993); Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* Vol. 49, pp. 107-121

OECD (2006); Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series Testing and Assessment, No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, sixth edition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, Journal of Industrial Microbiology 12, 195-199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, Nonlinear Regression, Wiley, 2003

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66, 298-312

Wang, Q., D.L. Denton, and R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 19, pp. 113–117, 2000.

▼M7

C.48. SAGGIO DI TOSSICITÀ A BREVE TERMINE SULLA RIPRODUZIONE DI PESCI

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 229 (2012). 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 tossicità a breve termine sulla riproduzione di 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 che agiscono sulla riproduzione dei pesci attraverso vari meccanismi, tra cui quelli endocrini (1, 2, 3, 4, 5). Tutti gli endpoint della linea guida dell'OCSE sono stati validati sui ciprinidi della specie *Pimephales promelas* (fathead minnow) e un sottoinsieme degli endpoint (la vitellogenina e i caratteri sessuali secondari) è stato validato sul medaka giapponese (*Oryzias latipes)* e sul danio zebrato *(Danio rerio)* (la vitellogenina). 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) e in parte da un comitato indipendente di esperti commissionato dall'Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti (29). Il saggio non mira a individuare specifici meccanismi di disfunzione ormonale giacché gli animali sperimentali possiedono un asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (asse HPG) sano, in grado di reagire alle sostanze che hanno effetti sull'asse HPG a vari livelli.

2. Il presente metodo di prova descrive un saggio di screening in vivo in cui pesci, maschi sessualmente maturi e femmine riproduttrici, sono esposti insieme a una sostanza chimica in esame, per un tempo limitato del loro ciclo biologico (21 giorni). Al termine del periodo di esposizione di 21 giorni, sono misurati uno o due biomarcatori dell'attività endocrina della sostanza chimica in esame, sia nei maschi che nelle femmine; questi biomarcatori sono la vitellogenina e i caratteri sessuali secondari. La vitellogenina viene misurata nelle specie *Pimephales promelas*, *Oryzias latipes* e *Danio rerio*, mentre i caratteri sessuali secondari sono valutati nella specie *Pimephales promelas* e *Oryzias latipes*. Inoltre, la fecondità quantitativa viene monitorata quotidianamente per tutta la durata della prova. Le gonadi sono preservate e un esame istopatologico può essere effettuato per valutare la capacità riproduttiva degli animali sperimentali e aumentare il peso dell'evidenza di altri endpoint.

3. Il presente saggio è una prova in vivo per lo screening riproduttivo 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» (30). In tale quadro concettuale il saggio di tossicità a breve termine sulla riproduzione di pesci è proposto al livello 3 come prova in vivo che fornisce dati riguardo alle vie e ai meccanismi endocrini selezionati.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

4. La vitellogenina (VTG) 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 secernere la vitellogenina in risposta ad una stimolazione estrogenica esogena.

▼M7

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 17β-estradiolo — induce una diminuzione del livello di VTG che 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 VTG 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* (sangue), *Danio rerio* (sangue o omogenati testa/coda) e *Oryzias latipes* (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 VTG sono descritte nell'appendice 6. Kit per la misurazione della VTG 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 le specie *Pimephales promelas* e *Oryzias latipes* 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* (20) e *Oryzias latipes* (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. Nel *Pimephales promelas* 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* 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* e *Oryzias latipes* sono contenute, rispettivamente, nelle appendici 5A e 5B.

9. Il saggio sui pesci, della durata di 21 giorni, comprende la valutazione della produzione quantitativa di uova e la preservazione delle gonadi per l'esame istopatologico facoltativo. Alcune autorità di regolamentazione possono richiedere questo ulteriore endpoint per una valutazione più completa della capacità riproduttiva degli animali sperimentali, o nei casi in cui la vitellogenina e i caratteri sessuali secondari non hanno risposto all'esposizione a sostanze chimiche. Sebbene alcuni endpoint possano essere altamente diagnostici (ad esempio l'induzione di VTG nei maschi e la formazione di tubercoli nelle femmine), nel saggio non tutti gli endpoint (ad esempio, la fecondità e l'istopatologia delle gonadi) sono destinati a individuare in modo inequivocabile specifici meccanismi di azione cellulari. La serie di endpoint, considerata nel complesso, consente piuttosto di trarre conclusioni riguardo ad eventuali disordini endocrini, fornendo quindi orientamenti per ulteriori prove. Anche se non specificamente legata al sistema endocrino, la fecondità, a causa della sua dimostrata sensibilità a sostanze che agiscono a livello endocrino (5), è un importante endpoint da includere, in quanto se essa e

▼M7

altri endpoint non sono influenzati da un determinato composto si può ritenere con ragionevole sicurezza che tale composto non agisca a livello endocrino. Se tuttavia la fecondità ne risente, essa contribuirà notevolmente a dare peso all'evidenza delle conclusioni. Indicazioni per l'interpretazione dei dati e l'accettazione dei risultati della prova sono fornite più avanti nel presente metodo di prova.

10. Le definizioni dei termini utilizzati nel presente metodo di prova sono contenute nell'appendice 1.

PRINCIPIO DELLA PROVA

11. Pesci maschi e femmine della medesima specie in stato riproduttivo sono esposti alle sostanze chimiche in esame 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 il danio zebrato sono utilizzate due vasche o repliche per trattamento (ciascuna vasca contiene 5 maschi e 5 femmine). Per *Pimephales promelas* sono utilizzate quattro vasche o repliche per trattamento (ciascuna vasca contiene 2 maschi e 4 femmine). Ciò permette di tener conto del comportamento territoriale del *Pimephales promelas* maschio preservando la potenza statistica della prova a un livello sufficiente. Per *Oryzias latipes* sono utilizzate quattro vasche o repliche per trattamento (ciascuna vasca contiene 3 maschi e 3 femmine). Il periodo di esposizione è di 21 giorni ed il campionamento dei pesci è effettuato al 21° giorno di esposizione. La fecondità quantitativa è monitorata quotidianamente.

12. 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* e in *Oryzias latipes* (v. appendice 5A e Appendice 5B); campioni di sangue sono prelevati per misurare la VTG nel danio zebrato e nel ciprinide; in alternativa può essere utilizzato anche un omogenato testa/coda per la determinazione della VTG nel danio zebrato (appendice 6), mentre a tal fine nel medaka sono effettuati prelievi epatici (appendice 6); le gonadi sono fissate intere o dissezionate per un possibile esame istopatologico (22).

CRITERI DI ACCETTAZIONE DELLA PROVA

13. Affinché i risultati della prova siano accettabili devono essere soddisfatte le seguenti condizioni:

— la mortalità nei controlli con acqua (o solvente) non eccede 10 per cento al termine del periodo di esposizione;

— la concentrazione dell'ossigeno disciolto è rimasta almeno al 60 per cento del valore di saturazione in aria per tutto il periodo di esposizione;

— la temperatura dell'acqua non differisce mai di oltre ± 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;

▼M7

— si può dimostrare che i pesci si riproducono attivamente in tutte le repliche prima di iniziare l'esposizione alla sostanza chimica e nelle repliche di controllo durante la prova.

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiature

14. 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 la specie Pimephales promelas e il danio zebrato; l'appendice 4 fornisce le necessarie indicazioni dettagliate;

f. bilancia sufficientemente precisa (precisione di ± 0,5 mg).

Acqua

15. Per la prova si può utilizzare qualunque tipo di acqua in cui la specie sperimentale dimostri di sopravvivere a lungo termine e di crescere in modo adeguato. La qualità dell'acqua deve essere costante per tutta la durata della prova. Il pH deve essere compreso tra 6,5 e 8,5, ma nel corso della medesima prova deve essere compreso entro un intervallo di ±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 prelevano e analizzano 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

16. 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» (23). La scelta del solvente è determinata dalle proprietà chimiche della sostanza o della miscela. Il documento di orientamento dell'OCSE raccomanda di non superare una concentrazione massima di 100 µl/l. Tuttavia un recente studio (24) 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).

▼M7

17. Nella prova va utilizzato un sistema 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

18. 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).

19. 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.

20. 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

21. Si raccomanda un periodo di pre-esposizione di una-due settimane, durante il 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 gli esemplari di *Danio rerio* dovrebbero avere un'età di circa 16 (±2) settimane, se allevati ad una temperatura di 26 ± 2 °C. La produzione di uova deve essere valutata quotidianamente durante la fase di pre-esposizione. Si raccomanda di includere i pesci nella fase di esposizione della prova quando la riproduzione è stata osservata in tutte le vasche di replica. In questa fase non si possono fornire indicazioni quantitative sulla produzione giornaliera di uova auspicabile, ma è piuttosto comune osservare una produzione media di > 10 uova al giorno per femmina per ciascuna specie. Si deve usare una disposizione a blocchi casuale in funzione della produzione di uova per assegnare le repliche ai vari livelli sperimentali al fine di garantire un'equilibrata distribuzione delle repliche.

▼M7

DISEGNO SPERIMENTALE

22. 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) (25).

23. Nel caso degli esemplari di *Danio rerio*, il 21° giorno di sperimentazione vengono prelevati campioni nei gruppi trattati per ciascun livello di concentrazione (5 maschi e 5 femmine in ciascuna delle due repliche) e nel gruppo (o nei gruppi) di controllo ai fini della misurazione della vitellogenina. Nel caso dei medaka, il 21° giorno di sperimentazione vengono prelevati campioni nei gruppi trattati per ciascun livello di concentrazione (3 maschi e 3 femmine in ciascuna delle quattro repliche) e nel gruppo (o nei gruppi) di controllo ai fini della misurazione della vitellogenina e della valutazione dei caratteri sessuali secondari. Nel caso dei ciprinidi il 21° giorno di esposizione vengono prelevati campioni nei gruppi trattati per ciascun livello di concentrazione) (2 maschi e 4 femmine in ciascuna delle quattro repliche) e nel gruppo (o nei gruppi) di controllo ai fini della misurazione della vitellogenina e della valutazione dei caratteri sessuali secondari. È necessaria una valutazione quantitativa della fecondità e i tessuti gonadici devono essere fissati interamente o dissezionati per un possibile esame istopatologico, se necessario.

Selezione delle concentrazioni sperimentali

24. Ai fini della prova la concentrazione massima è fissata al livello della concentrazione massima tollerata (MTC), 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 MTC 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 MTC possa essere stimata. La stima della MTC potrebbe essere inaccurata e richiede generalmente il giudizio professionale di un esperto.

25. 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.

PROCEDURA

Selezione e pesatura dei pesci da sottoporre alla prova

26. 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 mantenuto entro un margine di ±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

27. La durata del test è di 21 giorni, a seguito di un periodo di pre-esposizione. La durata raccomandata del periodo di pre-esposizione va da una a due settimane.

Alimentazione

28. 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

▼M7

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.

29. 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 (ad esempio 17-b estradiolo).

30. II 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

31. Il fotoperiodo e la temperatura dell'acqua devono essere adatti alla specie utilizzata (appendice 2).

Frequenza delle determinazioni e delle misurazioni analitiche

32. 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 della prova. 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.

33. 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 ± 20 % della concentrazione nominale, i risultati possono essere calcolati a partire dai valori nominali o misurati.

34. 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.

35. Durante la prova l'ossigeno disciolto, 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

36. Alcune risposte generali (ad esempio sopravvivenza) e biologiche (ad esempio livelli di VTG) sono valutate nel corso o al termine della prova. È necessario il monitoraggio quantitativo giornaliero della fecondità. La misurazione e la valutazione di questi parametri e la loro utilità sono descritti più sotto.

Sopravvivenza

37. 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 determinato mediante osservazione macroscopica delle gonadi.

▼M7

Comportamento e aspetto

38. 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. Negli esemplari di *Danio rerio*, il caratteristico comportamento di accoppiamento e riproduzione dopo le prime luci dell'alba è ridotto o ostacolato dall'esposizione agli estrogeni o agli antiandrogeni.

39. 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.

Fecondità

40. Osservazioni quantitative giornaliere della riproduzione vanno annotate sulla base delle repliche. La produzione di uova va registrata come il numero di uova per femmina superstite al giorno sulla base delle repliche. Le uova sono rimosse giornalmente dalle vasche sperimentali. Per i ciprinidi e il danio zebrato i substrati di riproduzione vanno posti nella vasca sperimentale per permettere ai pesci di riprodursi in condizioni normali. L'appendice 4 fornisce ulteriori dettagli dei substrati di riproduzione raccomandati per il danio zebrato (appendice 4A) e i ciprinidi (appendice 4B). Non si ritiene necessario fornire un substrato di riproduzione per i medaka.

Soppressione incruenta

41. 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, Metacaina, (MS 222) (CAS 886-86-2)] in soluzione di 100-500 mg/l tamponata con 300 mg/l $NaHCO_3$ (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 VTG (cfr. sezione sulla vitellogenina).

Osservazione dei caratteri sessuali secondari

42. 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 prominenti 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 (26, 27). Tali osservazioni morfologiche grossolane possono fornire

▼M7

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)

43. 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 zebrato. 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 VTG. Per contro, nei medaka è utilizzato un prelievo epatico e nel danio zebrato può essere impiegato un omogenato testa/coda come campione tissutale per la determinazione della VTG (appendice 6). La misurazione della VTG è basata 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.

44. Il controllo della qualità dell'analisi della VTG 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 VTG attese e almeno una prova in bianco di collegamento non specifica (analisi in duplicato). 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.

45. 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 $R^2 > 0,99$.

46. 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.

47. Ciascun giorno in cui è effettuata l'analisi della VTG, 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.

Esame istopatologico delle gonadi

48. L'esame istopatologico delle gonadi può essere richiesto dalle autorità di regolamentazione per esaminare l'organo bersaglio sull'asse HPG a seguito di un'esposizione chimica. A tale fine le gonadi sono fissate intere o dissezionate. Quando è richiesto un esame istopatologico, si cercano risposte specifiche relative agli effetti sul sistema endocrino nelle gonadi per valutare

▼M7

l'attività endocrina della sostanza chimica in esame. Tali risposte diagnostiche includono essenzialmente la presenza di ovociti testicolari, l'iperplasia delle cellule di Leydig, una minore formazione di tuorlo, l'aumento degli spermatogoni e l'iperplasia perifollicolare. Altre lesioni gonadiche, come l'atresia degli ovociti, la degenerazione testicolare e i cambiamenti di stadio, possono avere cause diverse. Il documento di orientamento sull'istopatologia gonadica dei pesci specifica le procedure da utilizzare per la dissezione, la fissazione, l'asportazione e la valutazione istopatologica delle gonadi (22).

DATI E RELAZIONE

Valutazione delle risposte dei biomarcatori mediante l'analisi della varianza (ANOVA)

49. Per individuare gli effetti potenziali di una sostanza chimica, 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) (28) 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 monotona. 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 (28) fornisce ulteriori informazioni in materia.

Elaborazione di relazioni sui risultati della prova

50. 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).

▼M7

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 disciolto, 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 disciolto;

— 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, la produzione di uova e la VTG;

— 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.

▼M7

ORIENTAMENTI PER L'INTERPRETAZIONE E L'ACCETTAZIONE DEI RISULTATI

51. 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.

52. 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.

53. 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 controllo 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 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 del saggio 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.

54. La quantificazione della produzione di uova è soggetta a importanti variazioni [il coefficiente di variazione (CV) può variare da 20 a 60 %] che incidono sulla capacità del saggio di individuare un calo significativo della produzione di uova inferiore al 70 % quando il CV ha un valore pari o superiore al 50 %. Quando il CV è limitato a valori più bassi (circa il 20-30 %), il saggio avrà una potenza accettabile (80 %) per individuare una diminuzione del 40-50 % di produzione delle uova. Il disegno sperimentale utilizzato per i ciprinidi, che prevede quattro repliche per livello di trattamento, dovrebbe dare più potenza al parametro della fecondità rispetto a un disegno sperimentale che prevede solo 2 repliche.

55. Se un laboratorio non ha mai effettuato la prova in precedenza o se sono state introdotte modifiche significative (ad esempio, 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-estradiolo a 100 ng/l 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 µg/l) con una conseguente diminuzione della VTG nelle femmine, e una sostanza usata per i controlli positivi dell'attività androgenica (17β-trenbolone a 5 µg/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.

56. In generale, le misurazioni della VTG 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 VTG può non

▼M7

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.

57. L'esame istopatologico gonadico può essere richiesto dalle autorità di regolamentazione al fine di determinare la capacità riproduttiva degli animali sperimentali e valutare il peso dell'evidenza dei risultati delle prove. Può non essere necessario eseguire l'esame istopatologico gonadico nei casi in cui la VTG o i caratteri sessuali secondari sono positivi (ossia quando la VTG aumenta o diminuisce o sono indotti caratteri sessuali secondari).

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, Paris.

(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 1 B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, Paris.

(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, Paris.

(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. 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, Paris.

(7) Sumpter J.P. and S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives; 103 Suppl 7:173-8 Review.

(8) Pawlowski S., *et al.* (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

(9) Andersen L., *et al* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

(10) Ankley G.T., *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences; 67(1):121-30.

▼M7

(11) Panter G.H., *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

(12) Parks L.G., *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

(13) Panter G.H., *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

(14) Fenske M., *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

(15) Holbech H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131

(16) Rose J., *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531-539.

(17) Brion F., *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

(18) Yokota H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87–98.

(19) Tatarazako N., *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.

(20) Ankley G.T., *et al.* (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, *et al* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

(22) OECD (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 123, Paris.

(23) 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

(24) Hutchinson T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

(25) Hutchinson T.H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as «signposts,» not «traffic lights,» in risk assessment. Environmental Health Perspectives; 114 Suppl 1:106-14.

▼M7

(26) Miles-Richardson S.R., *et al*. (1999). Effects of waterborne exposure to 17β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

(27) Martinovic D., *et al*. (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

(28) OECD (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.

(29) US EPA (2008), Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, dated 30 January 2008, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 110 pp.

(30) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150, OECD, Paris.

▼M7

Appendice 1

ABBREVIAZIONI E DEFINIZIONI

Sostanza chimica: sostanza o miscela

CV: coefficiente di variazione

ELISA: prova di immunoassorbimento enzimatico

HPG (Hypothalamic-pituitary-gonadal) Axis: asse ipotalamo-ipofisi-gonadi

Tasso di carico: peso a umido dei pesci per volume di acqua

MTC: concentrazione massima tollerata, che rappresenta circa il 10 % della LC_{50}

Densità della popolazione: numero di pesci per volume di acqua

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

VTG: la vitellogenina è una lipo-glico-fosfo-proteina precursore delle proteine del tuorlo normalmente prodotta dalle femmine sessualmente attive di tutte le specie ovipare

▼M7

Appendice 2

CONDIZIONI SPERIMENTALI PER LO SCREENING DEL SISTEMA ENDOCRINO DEI PESCI

1. Specie raccomandata	Fathead minnow (*Pimephales promelas*)	Medaka (*Oryzias latipes*)	Danio zebrato (*Danio rerio*)
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 sperimentali	Cfr. paragrafo 21	Cfr. paragrafo 21	Cfr. paragrafo 21
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)	6 (3 maschi e 3 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	4 minimo	2 minimo
16. Numero di pesci per concentrazione di prova	16 femmine adulte e 8 maschi (4 femmine and 2 maschi in ciascuna vasca di replica)	12 femmine adulte e 12 maschi (3 femmine and 3 maschi in ciascuna vasca di replica)	10 femmine adulte e 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

▼M7

18. Aerazione	Nessuna aerazione tranne se la concentrazione dell'ossigeno disciolto scende al di sotto del 60 % della salutazione dell'aria	Nessuna aerazione tranne se la concentrazione dell'ossigeno disciolto scende al di sotto del 60 % della salutazione dell'aria	Nessuna aerazione tranne se la concentrazione dell'ossigeno disciolto scende al di sotto del 60 % della salutazione dell'aria
19. Acqua di diluizione	Acqua di superficie, acqua di pozzo o ricostituita o acqua di rubinetto non clorata, pulita	Acqua di superficie, acqua di pozzo o ricostituita o acqua di rubinetto non clorata, pulita	Acqua di superficie, acqua di pozzo o ricostituita o acqua di rubinetto non clorata, pulita
20. Periodo di pre-esposizione	7-14 giorni (raccomandato)	7-14 giorni (raccomandato)	7-14 giorni (raccomandato)
21. Durata dell'esposizione chimica	21 giorni	21 giorni	21 giorni
22. Parametri biologici valutati (endpoint)	— sopravvivenza — comportamento — fecondità — caratteri sessuali secondari — VTG — istopatologia gonadica facoltativa	— sopravvivenza — comportamento — fecondità — caratteri sessuali secondari — VTG — istopatologia gonadica facoltativa	— sopravvivenza — comportamento — fecondità — VTG — istopatologia gonadica facoltativa
23. Criteri di validità della prova	Ossigeno disciolto ≥ 60 % del valore di saturazione; temperatura 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 disciolto ≥ 60 % del valore di saturazione; temperatura 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 disciolto ≥ 60 % del valore di saturazione; temperatura 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.

▼**M7**

Appendice 3

ALCUNE CARATTERISTICHE CHIMICHE DI UN'ACQUA DI DILUIZIONE ACCETTABILE

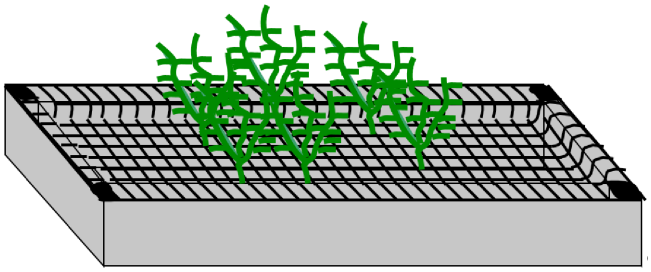
COMPONENTE	CONCENTRAZIONI
Particolato	< 20mg/l
Carbonio organico totale	< 2 mg/l
Ammoniaca non ionizzata	< 1 µg/l
Cloro residuo	< 10 µg/l
Pesticidi organofosforati totali	< 50 ng/l
Pesticidi organoclorurati totali più difenili policlorurati	< 50 ng/l
Cloro organico totale	< 25 ng/l

▼M7

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 nell'acqua 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.

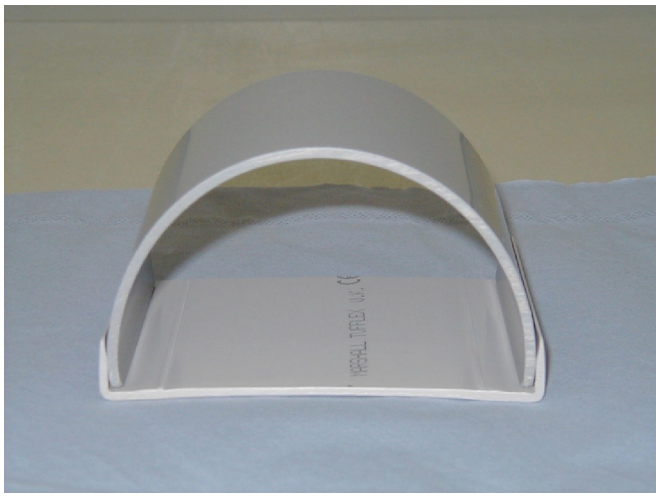
▼**M7**

Appendice 4B

SUBSTRATO DI RIPRODUZIONE PER LA SPECIE *PIMEPHALES PROMELAS*

Due o tre piastre e piatti di riproduzione combinati in plastica/ceramica/vetro o acciaio inossidabile sono collocati in ciascuna vasca sperimentale (ad esempio 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 stato dimostrato 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 lisciviati per almeno 12 ore in acqua di diluizione prima dell'uso.

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas.* Aquatic Toxicology, 81, 90–98.

▼M7

Appendice 5A

VALUTAZIONE DEI CARATTERI SESSUALI SECONDARI DI *PIMEPHALES PROMELAS* AI FINI DELL'INDIVIDUAZIONE DI DETERMINATE SOSTANZE ATTIVE A LIVELLO ENDOCRINO

Sintesi

Negli esemplari 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; ad esempio, gli antagonisti dei recettori degli androgeni, quali il 17α-metiltestosterone o il 17β-trenbolone, possono provocare l'insorgere di tubercoli nuziali nei ciprinidi femmina (Smith 1974; Ankley et al. 2001; 2003), mentre gli antagonisti dei ricettori degli estrogeni possono ridurre il numero o la dimensione dei tubercoli nuzionali nei maschi (Miles-Richardson et al. 1999; Harries et al. 2000).

Segue una descrizione della caratterizzazione dei tubercoli nuziali 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).

— 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.

— Ripetere l'osservazione sulla parte ventrale della testa, dopo aver collocato nella capsula di Petri il pesce sul dorso, parte anteriore verso l'avanti.

— Le osservazioni non dovrebbero superare i 2 minuti per ciascun esemplare.

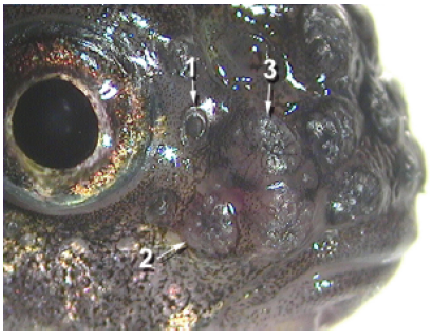
▼M7

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 stato 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- tubercolo presente: un tubercolo che ha un unico punto di altezza quasi uguale al raggio. 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 compreso tra 18 e 20 (Jensen et al. 2001).

Figura 1



Alcuni pesci possono presentare più tubercoli di quelli risultanti dalle caselle del modello 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 in coppia 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 di controllo 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 estesi o prominenti nei maschi di controllo maturi. Presenti o estesi nei maschi meno sviluppati o nelle femmine esposte a androgeni.

▼M7

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.

BIBLIOGRAFIA

(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 17α-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows *(Pimephales promelas). Can J Zool* 52:1031-1038.

Matrice dei tubercoli

ID _____

Data _____

Punteggio totale _____

Classificazione numerica

1-present

2- esteso

3- prominente

	A	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	B	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						
	C	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
	D	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**
		E	**X1**	**X1**							
	F	**X1**	**X1**	**X1**	**X1**						

▼M7

Appendice 5B

VALUTAZIONE DEI CARATTERI SESSUALI SECONDARI NEL MEDAKA AL FINE DI INVIDIDUARE ALCUNE SOSTANZE CHIMICHE CON ATTIVITÀ ENDOCRINA

Di seguito è descritta la misurazione dei processi papillari ([1]), che costituiscono i caratteri sessuali secondari nel medaka (*Oryzias latipes*).

(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 pterigioforo).

(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 registrarne la somma in un foglio Excel

([1]) 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). Tuttavia è raro che i processi siano presenti sul primo raggio della pinna 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).

▼M7

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. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

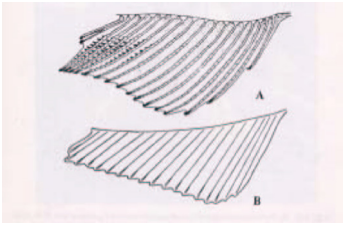


Figura 2.

A, Processi che avvengono sui segmenti congiunti del raggio della pinna anale. J.P. (*joint plate*), 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. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

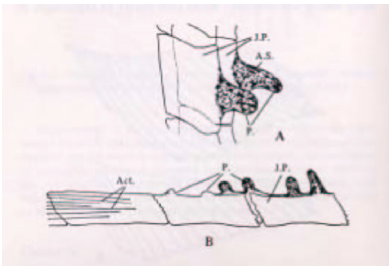
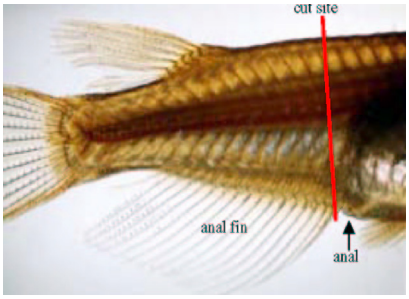


Figura 3.

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 %.



▼M7

Appendice 6

PROCEDURE RACCOMANDATE PER I PRELIEVI EFFETTUATI AI FINI DELL'ANALISI DELLA VTG

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 VTG. 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 1 B: 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 della 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: 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 dei caratteri sessuali secondari mediante microscopio stereoscopico.

Escissione del fegato

(1) Trasferire i pesci oggetto della prova dal contenitore di trasporto alla soluzione anestetica mediante retino.

▼M7

(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) Collocare il pesce con l'addome verso l'alto. 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) Tappare la microprovetta contenente il fegato e conservarla in un supporto di raffreddamento (o un supporto ghiacciato).

(16) Dopo ogni escissione di fegato, pulire gli strumenti di dissezione oppure sostituirli con strumenti puliti.

▼M7

(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 o 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 prossima postazione di lavoro in un supporto di raffreddamento (o un supporto ghiacciato).

Dopo l'escissione del fegato, la carcassa è pronta per l'esame istologico delle gonadi e la misurazione dei caratteri sessuali secondari.

Campioni

Conservare i campioni di fegato prelevati dai pesci oggetto di prova ad una temperatura di ≤ – 70 °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.

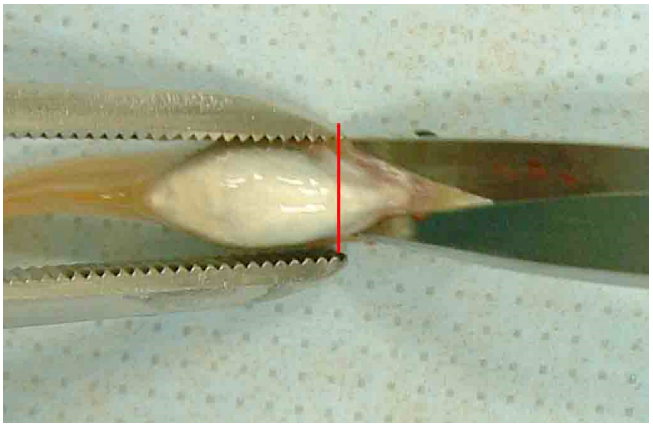
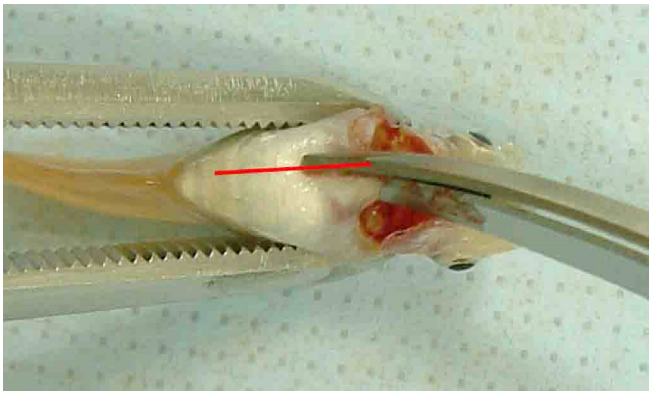


Figura 2

Tagliare la linea mediana dell'addome con forbici da un punto situato a circa 2 mm dal cranio fino all'ano.



▼M7

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 indica il fegato.

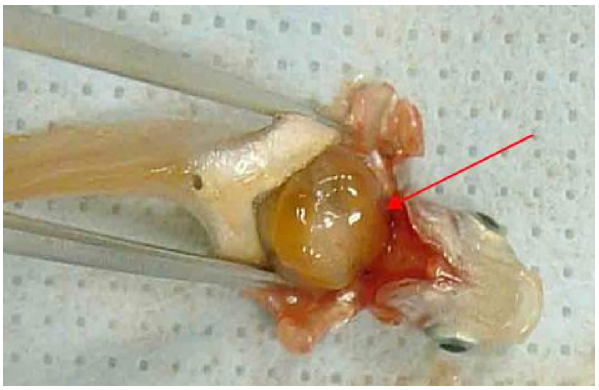


Figura 4

Il fegato è dissezionato e rimosso mediante le pinzette.

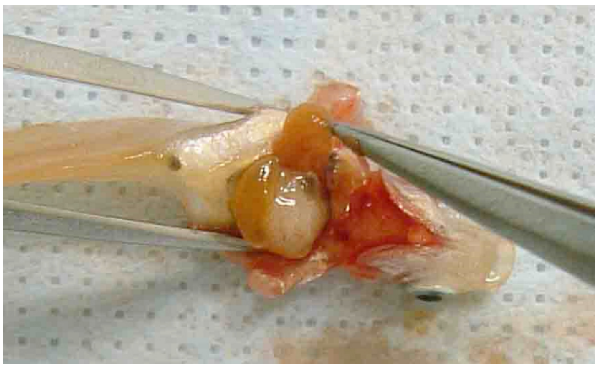
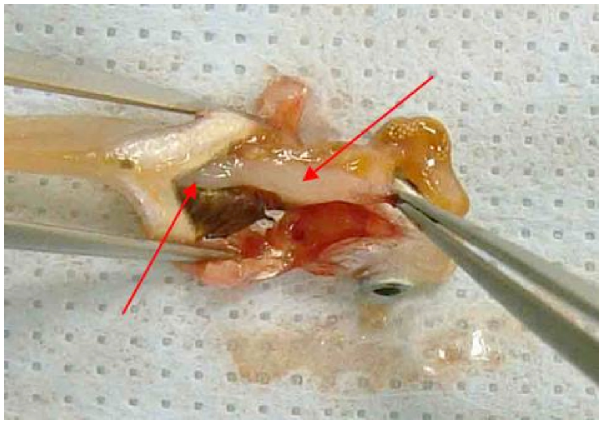


Figura 5

Gli intestini sono rimossi delicatamente con le pinzette.



▼M7

Figura 6

Le due estremità degli intestini e gli attacchi del mesenterio sono separati con le forbici.

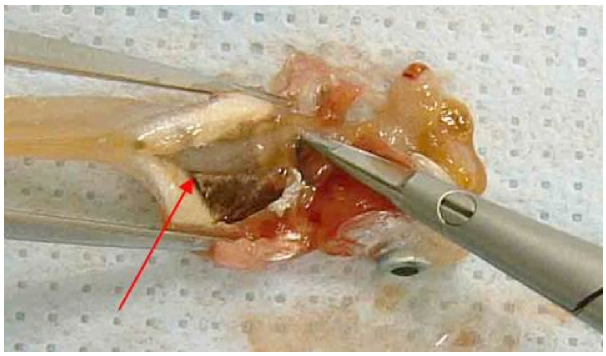


Figura 7 (femmina)

La procedura è identica per le femmine.

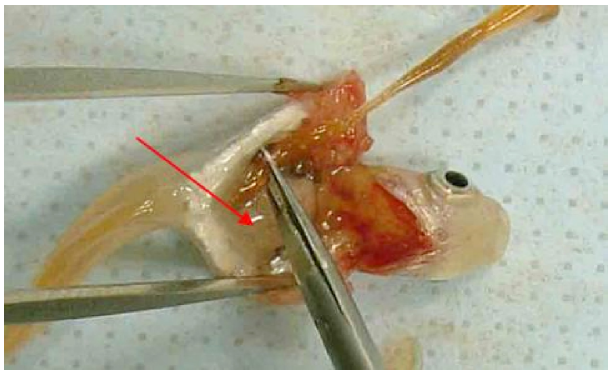
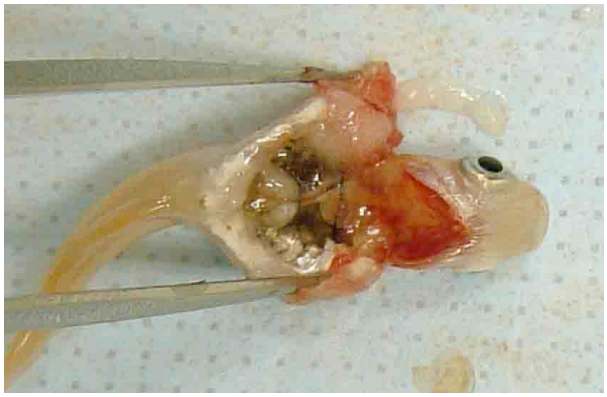


Figura 8

Procedura completata.



▼M7

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 raffreddarla con ghiaccio tritato (temperatura della soluzione: ≤ 4 °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 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 effettuato 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 omogenato

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.

Rimuovere il tampone di omogeneizzazione dalla bottiglia del reagente e aggiungere il tampone nella microprovetta da 1,5 ml contenente il fegato.

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

— Attaccare un nuovo pestello di omogeneizzazione all'omogeneizzatore della microprovetta.

— 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.

— Attivare l'omogeneizzatore per 10-20 secondi. Raffreddare la microprovetta con ghiaccio tritato durante l'operazione.

▼M7

— Ritirare il pestello dalla microprovetta e lasciar riposare per una decina di secondi. Procedere quindi a un'ispezione visiva dello stato della sospensione.

— Se si osservano pezzi di fegato nella sospensione, ripetere le operazioni (3) e (4) per ottenere un omogenato epatico soddisfacente.

— Conservare al fresco l'omogenato epatico in sospensione nel supporto ghiacciato fino alla sua centrifugazione.

— Utilizzare un pestello nuovo per ciascun omogenato.

— Omogeneizzare tutti i fegati con tampone di omogeneizzazione seguendo la procedura sopra descritta.

3) Centrifugazione dell'omogenato epatico in sospensione

— Verificare che la temperatura della centrifuga refrigerata sia ≤ 5 °C.

— Introdurre le microprovette da 1,5 ml contenenti l'omogenato epatico in sospensione nella centrifuga refrigerata (riequilibrare se necessario).

— Centrifugare l'omogenato epatico in sospensione per 10 minuti a 13 000 g ad una temperatura ≤ 5 °C. Tuttavia, se i supernatanti sono adeguatamente separati, la forza centrifuga e la durata di centrifugazione possono essere adeguate come necessario.

— 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.

— 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

— Riporre quattro microprovette da 0,5 ml per la conservazione del supernatante nel supporto per provette.

— 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.

— Raccogliere il supernatante e versarlo in altre due microprovette da 0,5 ml seguendo la procedura sopra descritta.

— Raccogliere il resto del supernatante con la micropipetta (se possibile: ≥ 100 µl). 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.

— Tappare la microprovetta da 0,5 ml e registrare il volume del supernatante sull'etichetta. Trasferire immediatamente le microprovette sul supporto ghiacciato.

— 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.

▼M7

— Versare tutto il supernatante centrifugato in quattro microprovette da 0,5 ml seguendo la procedura sopra descritta.

— 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.

— 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 ≤ – 70 °C fino all'esecuzione dell'analisi ELISA.

Procedura 3A: Prelievo di campioni ematici dall'arteria/vena caudale nel danio zebrato

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 microlitri in funzione della dimensione del pesce. Un volume equivalente di tampone di aprotinina [6 microgrammi/ml di soluzione salina tamponata al fosfato (PBS)] è aggiunto al tubo 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 VTG o di altre proteine di interesse.

Procedura 3B: Prelievo di sangue mediante puntura cardiaca nel danio zebrato

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 microlitri) 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 zebrato. 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*) e dovrebbe essere conservato a – 80 °C fino al momento dell'analisi.

Procedura 3C POS: omogeneizzazione della testa e della coda nel danio zebrato

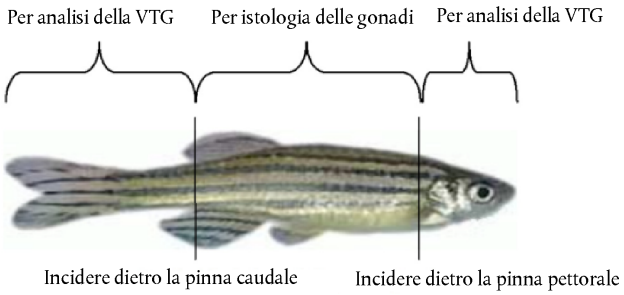
1. I pesci sono anestetizzati e soppressi in modo incruento come da protocollo sperimentale.

2. La testa e la coda del pesce sono tagliate come indicato da figura 1.

Importante: *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.*

▼**M7**

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). Importante: *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** ([1]) ghiacciato del peso pari a 4 volte il peso dei tessuti. Continuare a lavorare di pestello fino a che la miscela non risulti omogenea. Nota importante: *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.

([1]) 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.

▼M7

Appendice7

CAMPIONI FORTIFICATI DI VITELLOGENINA E STANDARD DI RIFERIMENTO INTER-PROVA

Ogni giorno in cui sono effettuate prove sulla VTG, è analizzato un campione fortificato in applicazione di uno standard di riferimento inter-prova. La VTG utilizzata per preparare lo standard di riferimento inter-prova proverrà da un lotto diverso da quello utilizzato per preparare gli standard di calibrazione per la prova in corso.

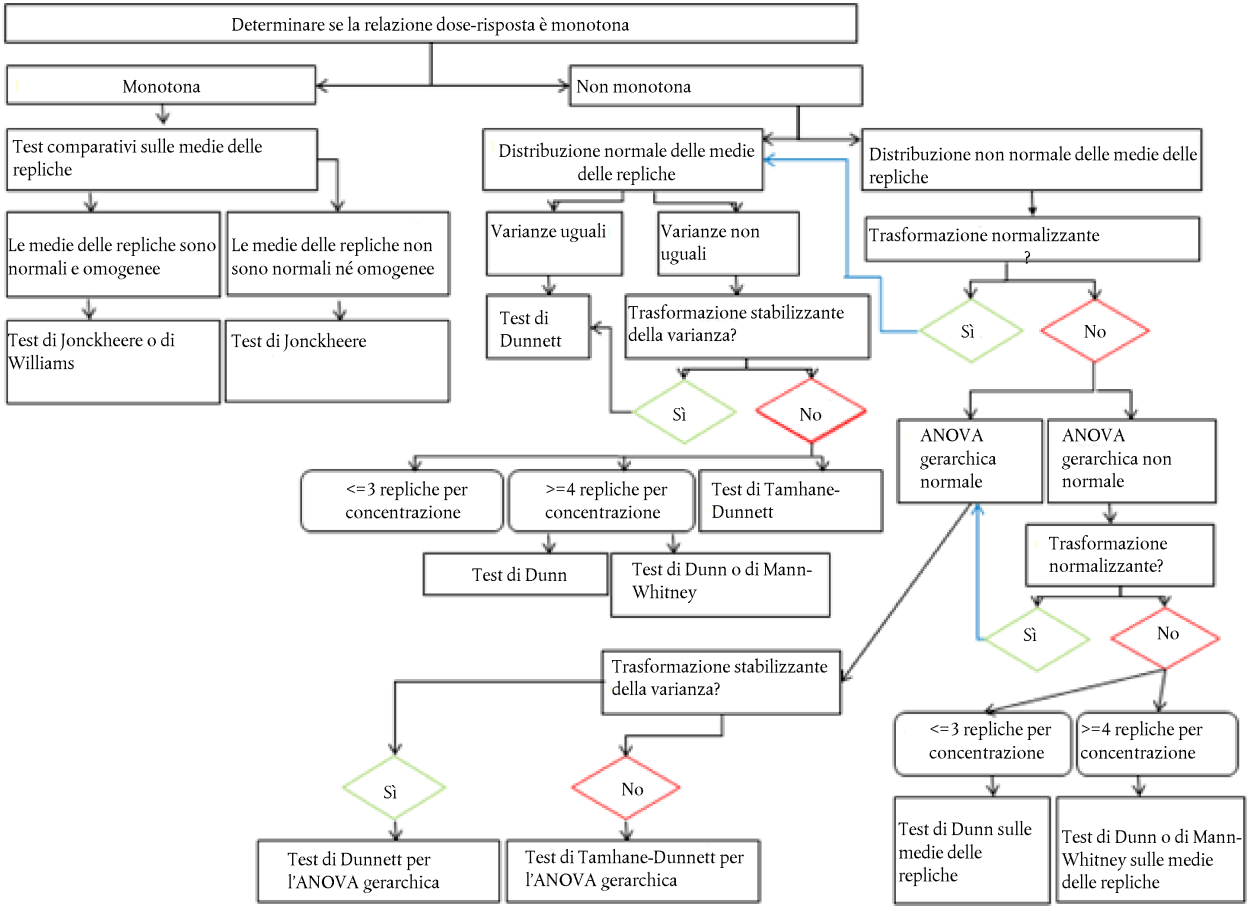
Per preparare il campione fortificato, si aggiunge una quantità nota di standard inter-prova ad un campione di plasma di esemplare maschio di controllo. Il campione sarà ulteriormente fortificato fino a raggiungere una concentrazione di VTG da 10 a 100 volte superiore alla concentrazione di VTG prevista 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 VTG di entrambi i campioni non fortificati di plasma di maschio di controllo viene aggiunta alla quantità calcolata di VTG 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.

▼M7

Appendice 8

DIAGRAMMA DECISIONALE PER L'ANALISI STATISTICA



02008R0440 — IT — 08.01.2026 — 011.001 — 1561

▼M7

C.49. PROVA DI TOSSICITÀ ACUTA SUGLI EMBRIONI DI PESCI

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 236 (2013). Descrive una prova di tossicità acuta sugli embrioni di danio zebrato (*Danio rerio*) intesa a determinare la tossicità acuta di sostanze chimiche sui pesci allo stadio embrionale. Basata sugli studi e sulle attività di convalida effettuate sul danio zebrato (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11) (12)(13)(14), la prova si è dimostrata valida per saggiare un'ampia serie di sostanze chimiche caratterizzate da meccanismi d'azione, solubilità, volatilità e idrofobia diversi (cfr. paragrafi 15 e 16).

2. Le definizioni dei termini utilizzati nel presente metodo di prova figurano nell'appendice 1.

PRINCIPIO DELLA PROVA

3. Si espongono per 96 ore alla sostanza chimica in esame uova di danio zebrato appena fecondate. Ogni 24 ore si registra l'osservazione di uno o più dei quattro endpoint apicali indicatori di letalità (6): i) coagulazione delle uova fecondate, ii) mancata formazione dei somiti, iii) mancato distacco dell'abbozzo caudale dal sacco vitellino, iv) assenza di battito cardiaco. Al termine del periodo di esposizione si determina la tossicità acuta in base all'esito positivo di uno dei quattro endpoint apicali registrati e si calcola l'LC_{50}.

CONSIDERAZIONI INIZIALI

4. La formula strutturale, il peso molecolare, la purezza, la stabilità in acqua e alla luce, il pK_a, il K_{ow}, l'idrosolubilità, la pressione di vapore e i risultati di una prova di pronta biodegradabilità (metodo di prova C.4 (17) o C. 29 (18)) sono informazioni utili sulle proprietà della sostanza. La solubilità e la pressione di vapore possono essere utilizzate per calcolare la costante di Henry, che indica il rischio di perdite per evaporazione della sostanza chimica durante la prova. Occorre inoltre disporre di un metodo d'analisi affidabile per la determinazione quantitativa della sostanza nelle soluzioni di prova, la cui precisione e il limite di quantificazione siano noti e descritti in letteratura.

5. Se il presente metodo è utilizzato per saggiare una miscela, la composizione di quest'ultima dovrebbe essere per quanto possibile caratterizzata, in particolare, mediante l'identità chimica dei suoi componenti, i quantitativi in cui sono presenti e le loro proprietà in quanto sostanze (cfr. paragrafo 4). Prima di utilizzare il metodo di prova per saggiare una miscela a fini regolamentari, occorre verificare se genererà risultati accettabili per il fine regolamentare previsto.

6. Per quanto riguarda le sostanze che possono essere attivate metabolicamente, è comprovato che gli embrioni di danio zebrato hanno capacità di biotrasformazione (19) (20) (21) (22). Tuttavia, la capacità metabolica degli embrioni non è sempre simile a quella dei pesci giovani o adulti; ad esempio, le proprietà protossiche dell'alcol allilico (9) non sono state riconosciute dal presente metodo di prova. Pertanto, se vi sono elementi indicanti l'eventualità che i metaboliti o altri prodotti di trasformazione pertinenti siano più tossici del composto di partenza, si raccomanda di eseguire la prova con tali metaboliti/prodotti di trasformazione e di utilizzare anche questi risultati al momento di trarre le conclusioni sulla tossicità della sostanza chimica in esame; oppure si raccomanda di eseguire un'altra prova che tenga meglio conto del metabolismo.

7. Si presume che gli embrioni non siano sensibili alle sostanze con peso molecolare ≥ 3kDa, la cui struttura molecolare è molto voluminosa, o quelle che ritardano la schiusa, rischiando di impedire o ridurre l'esposizione post schiusa, a causa della modesta biodisponibilità; potrebbero pertanto essere più appropriate altre prove di tossicità.

▼M7

VALIDITÀ DELLA PROVA

8. Affinché i risultati della prova siano validi devono essere soddisfatti i seguenti criteri:

a) tasso globale di fecondazione delle uova raccolte pari o superiore al 70 % del lotto sottoposto a prova;

b) temperatura dell'acqua costante a 26 ± 1 °C nei recipienti di prova in ogni momento della prova;

c) sopravvivenza complessiva degli embrioni nel controllo negativo (acqua di diluizione) e, se del caso, nel controllo del solvente pari o superiore al 90 % alla fine del periodo di esposizione di 96 ore;

d) mortalità minima del 30 % nel controllo positivo (ad esempio, per il danio zebrato, esposizione a 4,0 mg/l di 3,4-dicloroanilina) alla fine del periodo di esposizione di 96 ore;

e) tasso di schiusa nel controllo negativo (e nel controllo del solvente, se del caso) superiore all'80 % alla fine del periodo di esposizione di 96 ore;

f) concentrazione dell'ossigeno disciolto nel controllo negativo e nelle concentrazioni massima di prova pari o superiore all'80 % del valore di saturazione alla fine del periodo di esposizione di 96 ore.

DESCRIZIONE DEL METODO

9. Una sintesi delle modalità di mantenimento e delle condizioni sperimentali raccomandate figura nell'appendice 2.

Strumentazione

10. È necessaria la seguente strumentazione:

a) vasche in materiale chimicamente inerte (ad esempio, vetro) e di capacità adeguata al carico raccomandato (cfr. paragrafo 14 Mantenimento dei pesci riproduttori);

b) microscopio rovesciato e/o binoculare con capacità d'ingrandimento di almeno 80x. Se la temperatura del locale utilizzato per registrare le osservazioni non può essere regolata a 26 ± 1 °C, è necessario un tavolino riscaldante a movimento incrociato o altri metodi che mantengano costante la temperatura;

c) recipienti di prova; ad esempio, piastre standard a 24 pozzetti con una profondità di circa 20 mm (cfr. paragrafo 11, Recipienti di prova);

d) pellicola autoadesiva, ad esempio, per coprire le piastra a 24 pozzetti;

e) incubatore o locale climatizzato con regolazione della temperatura, che consenta di mantenere la temperatura a 26 (± 1) °C nei pozzetti (o nei recipienti di prova);

f) pH-metro;

g) misuratore di ossigeno;

h) materiale per la determinazione della durezza e della conduttività dell'acqua;

i) gabbia di riproduzione: piatto per strumenti, in vetro, acciaio inossidabile o altro materiale inerte; rete di acciaio inossidabile o di altro materiale inerte (con maglie di 2 ± 0,5 mm), per proteggere le uova deposte; substrato di riproduzione (ad esempio, piante artificiali di materiale inerte) (metodo di prova C. 48, appendice 4A (23));

j) pipette con imboccatura ampia per la raccolta delle uova;

▼M7

k) recipienti di vetro per preparare diverse concentrazioni di prova e l'acqua di diluizione (becher, palloni graduati, cilindri graduati, pipette graduate) o per raccogliere le uova (ad esempio, becher, cristallizzatori);

l) se si utilizzano altri sistemi di esposizione, ad esempio a flusso continuo (24) o passivi (25), occorrono locali e strumentazione idonei.

Recipienti di prova

11. Si utilizzano recipienti in vetro o polistirene (ad esempio, piastre a 24 pozzetti di capacità compresa tra 2,5 e 5 ml per pozzetto). Nel caso in cui si sospetti un adsorbimento nel polistirene (ad esempio, quando si saggiano sostanze apolari, planari con valore K_{OW} elevato), per ridurre le perdite dovute all'adsorbimento si utilizzano materiali inerti (vetro) (26). I recipienti di prova sono collocati nell'incubatore in modo casuale.

Acqua e condizioni sperimentali

12. Si raccomanda di diluire l'acqua di mantenimento per ottenere gradi di durezza tipici di molte acque di superficie. L'acqua di diluizione è preparata a partire da acqua ricostituita (27). Il grado di durezza ottenuto con la diluizione deve essere equivalente a 100-300 mg/l di $CaCO_3$ per impedire un'eccessiva precipitazione del carbonato di calcio. Si può utilizzare altra acqua di superficie o di sorgente ben caratterizzata. Per ottenere un'acqua di mantenimento a bassa durezza, l'acqua ricostituita può essere diluita con acqua deionizzata secondo un rapporto massimo di 1:5 fino a raggiungere una durezza minima di 30-35 mg/l di $CaCO_3$. Prima di introdurvi la sostanza chimica in esame, l'acqua è aerata fino a saturazione dell'ossigeno. La temperatura nei pozzetti è mantenuta a 26 ± 1 °C per l'intera durata della prova. Il pH deve essere compreso tra 6,5 e 8,5 e non variare all'interno di questo intervallo di non oltre 1,5 unità durante la prova; se si ritiene che il pH non si manterrà entro l'intervallo, occorre regolarlo prima di iniziare la prova. La regolazione del pH deve essere effettuata in modo che la concentrazione della soluzione madre non vari in modo significativo e che non si producano reazioni chimiche o precipitazione della sostanza chimica in esame. Per correggere il pH nelle soluzioni contenenti la sostanza chimica in esame, si raccomanda di utilizzare acido cloridrico (HCl) e idrossido di sodio (NaOH).

Soluzioni di prova

13. Le soluzioni di prova alle concentrazioni prescelte sono in genere preparate per diluizione di una soluzione madre. Le soluzioni madre sono di preferenza preparate semplicemente miscelando o agitando la sostanza chimica in esame nell'acqua di diluizione con mezzi meccanici (agitazione e/o ultrasuoni, ad esempio). Se la sostanza chimica in esame si scioglie con difficoltà in acqua, si seguono le procedure descritte nel documento di orientamento dell'OCSE n. 23 sulle prove di tossicità in ambiente acquatico di sostanze o miscele difficili (28). L'uso di solventi dovrebbe essere evitato, ma in alcuni casi può rendersi necessario per ottenere una soluzione madre di adeguata concentrazione. Se si utilizza un solvente nella preparazione delle soluzioni madre, la sua concentrazione finale non deve superare 100 µl/l e deve essere uguale in tutti i recipienti; l'uso di solventi richiede un controllo supplementare con solvente.

Mantenimento dei pesci riproduttori

14. Per la produzione delle uova si impiega uno stock di dani zebrati riproduttori selvatici e non esposti, con tasso di fecondazione ben documentato. I pesci non devono presentare sintomi di infezione e malattia riscontrabili all'esame macroscopico e non devono avere ricevuto alcun trattamento farmacologico (acuto o profilattico) nei due mesi precedenti la deposizione delle uova. I pesci riproduttori sono tenuti in acquari con capacità di carico raccomandata di 1 litro d'acqua per pesce e fotoperiodo fisso di 12-16 ore (29) (30) (31) (32) (33). Il filtraggio va regolato alla velocità ottimale, evitando velocità

▼M7

eccessive che provocano forti perturbazioni dell'acqua. Per i dettagli sull'alimentazione si veda l'appendice 2. Occorre evitare un'alimentazione troppo abbondante e controllare regolarmente la qualità dell'acqua e la pulizia degli acquari ripristinando, se necessario, le condizioni iniziali.

Prove di competenza

15. Per verificare la sensibilità del ceppo di pesci utilizzati si saggia, preferibilmente due volte l'anno, la 3,4-dicloroanilina come sostanza di riferimento (utilizzata negli studi di convalida (1) (2)) ottenendo una serie completa di dati sulla relazione concentrazione-risposta. I laboratori che eseguono questa prova per la prima volta sono tenuti a utilizzare la sostanza di riferimento. I laboratori che devono presentare i dati a fini di regolamentazione possono utilizzare questa sostanza chimica per dimostrare di possedere le competenze tecniche richieste per eseguire la prova.

Produzione delle uova

16. Le uova di danio zebrato possono essere prodotte mediante gruppi di riproduzione (in vasche di riproduzione apposite) o riproduzione di massa (nelle vasche di mantenimento). Nel primo caso s'introducono i maschi e le femmine di un gruppo (ad esempio, in un rapporto di 2:1) nelle vasche di riproduzione alcune ore prima dell'imbrunire del giorno prima della prova. Poiché i gruppi di riproduzione di dani zebrati talvolta non riescono a deporre le uova, si raccomanda l'uso in parallelo di almeno tre vasche di riproduzione. Per evitare errori statistici di natura genetica, si raccolgono le uova di almeno tre gruppi riproduttori, le si mescolano e si selezionano in modo casuale.

17. Per la raccolta delle uova, si collocano delle gabbie nelle vasche di riproduzione o in quelle di mantenimento prima dell'imbrunire del giorno precedente alla prova o prima dell'alba del giorno stesso della prova. Poiché i pesci adulti divorano le uova, si coprono le gabbie con rete metallica di materiale inerte con maglie di dimensioni appropriate (circa 2 ± 0,5 mm). Se necessario, si fissano alle maglie della rete alcune piante artificiali di materiale inerte (ad esempio, in plastica o vetro) come stimolo di riproduzione (3) (4) (5) (23) (35), avendo cura di utilizzare materie plastiche degradate che non rilascino sostanze contaminanti (ftalati, ad esempio). L'accoppiamento, la deposizione delle uova e la fecondazione avvengono nei 30 minuti successivi alle prime luci dell'alba, dopodiché si può procedere delicatamente alla rimozione delle gabbie in cui sono state depositate le uova. Si raccomanda di sciacquare con acqua ricostituita le uova raccolte dalle gabbie di riproduzione.

Differenziazione delle uova

18. A una temperatura di 26 °C, dopo circa 15 minuti dalla fecondazione nelle uova ha inizio la segmentazione, con divisioni sincrone consecutive che formano 4, 8, 16 e 32 blastomeri (cfr. appendice 3 (35)). In questi stadi, lo sviluppo della blastula permette d'individuare chiaramente le uova fecondate.

PROCEDURA

Condizioni di esposizione

19. Si espongono alla sostanza chimica in esame venti embrioni per concentrazione (un embrione per pozzetto). L'esposizione è eseguita in modo da mantenere durante l'intera prova la concentrazione della sostanza chimica al ± 20 % della concentrazione nominale. Se non è possibile soddisfare questa condizione in un sistema statico, si allestisce un sistema semistatico con rinnovo a una cadenza praticabile (ad esempio, ogni 24 ore). In questo caso si verificano le concentrazioni di esposizione almeno alle concentrazioni di prova minima e massima, all'inizio e alla fine di ciascun intervallo di esposizione (cfr. paragrafo 36). Se non è possibile mantenere la concentrazione di esposizione a ± 20 % della concentrazione nominale, si misurano tutte le concentrazioni all'inizio e alla fine di ciascun intervallo di esposizione (cfr. paragrafo 36). Al momento del rinnovo si procede in modo che

▼M7

gli embrioni rimangano coperti da una piccola quantità della vecchia soluzione di prova per evitare la disidratazione. Il disegno sperimentale può essere adattato per soddisfare i requisiti di prova di particolari sostanze (ad esempio, sistemi di dosaggio a flusso continuo (24) o passivi (25) per le sostanze facilmente degradabili o fortemente adsorbenti (29), oppure altri sistemi per le sostanze volatili (36) (37)). In ogni caso occorre ridurre al minimo qualsiasi fonte di stress per gli embrioni. Si condizionano i recipienti con le soluzioni di prova almeno 24 ore prima di avviare la prova. L'appendice 2 contiene una sintesi delle condizioni sperimentali.

Concentrazioni di prova

20. Per soddisfare i criteri statistici si utilizzano di norma cinque concentrazioni della sostanza chimica in esame, intervallate secondo un fattore costante non superiore a 2,2; qualora se ne utilizzino meno di cinque occorre fornire una giustificazione. La concentrazione massima saggiata dovrebbe produrre una mortalità del 100 % e la concentrazione minima non dovrebbe causare alcun effetto osservabile, come indicato nel paragrafo 28. Per definire l'intervallo appropriato delle concentrazioni, prima di procedere alla prova finale si esegue una prova preliminare; a tal fine si utilizzano in genere dieci embrioni per concentrazione e piastre a 24 pozzetti, come da istruzioni fornite in appresso. Se si utilizzano recipienti di prova diversi (ad esempio, piccole capsule Petri) o si saggia un numero maggiore di concentrazioni, le istruzioni devono essere adeguate di conseguenza.

21. Nel paragrafo 27 e nell'appendice 4, figura 1, si trovano, rispettivamente, le istruzioni e lo schema della distribuzione delle concentrazioni nelle piastre a 24 pozzetti.

Controlli

22. Si allestiscono controlli dell'acqua di diluizione, sia negativi sia all'interno di ciascuna piastra. Se si osserva più di un decesso tra gli embrioni del controllo interno la piastra è esclusa dalla prova, il che riduce il numero delle concentrazioni usate per determinare l'LC_{50}. In caso di esclusione di un'intera piastra la capacità di valutare e distinguere gli effetti osservati può diventare più difficile, in particolare se la piastra esclusa contiene il controllo del solvente o embrioni esposti che risultano anch'essi pregiudicati. Nel primo caso, la prova deve essere ripetuta; nel secondo caso la perdita della totalità di uno o più gruppi esposti a causa della mortalità nel controllo interno rischia di limitare la capacità di valutare gli effetti e determinare il valore dell'LC_{50}.

23. Per ciascun lotto di uova utilizzate nella prova si allestisce un controllo positivo a una concentrazione fissa di 4 mg/l di 3,4-dicloroanilina.

24. Se si utilizza un solvente, si allestisce il relativo controllo esponendo al solvente un gruppo supplementare di 20 embrioni in una piastra separata a 24 pozzetti. La prova si considera accettabile se si dimostra che il solvente non ha effetti significativi sui tempi della schiusa, sulla sopravvivenza, né produce altri effetti nocivi sugli embrioni (cfr. paragrafo 8, lettera c).

Inizio dell'esposizione e durata della prova

25. Si avvia la prova non appena possibile dopo la fecondazione delle uova e la si conclude dopo 96 ore di esposizione. Si immergono gli embrioni nelle soluzioni di prova prima che abbia inizio la segmentazione della discoblastula oppure, al più tardi, prima dello stadio a 16 blastomeri. Affinché l'esposizione inizi il più rapidamente possibile, entro 90 minuti dalla fecondazione si selezionano le uova in numero almeno doppio rispetto a quello necessario per ogni gruppo esposto e le si distribuisce casualmente nelle rispettive concentrazioni e controlli (ad esempio, in cristallizzatori da100 ml, ricoprendole completamente di soluzione).

26. Entro 180 minuti dalla fecondazione si separano le uova fecondate vitali da quelle non fecondate e le si trasferisce in piastre a 24 pozzetti precondizionate per 24 ore e riempite nuovamente con 2 ml di soluzione di prova fresca per pozzetto. Con l'ausilio di uno stereomicroscopio (preferibilmente con

▼M7

ingrandimento ≥30x) si selezionano le uova fecondate in fase di segmentazione che in questo processo non presentano evidenti irregolarità (ad esempio, asimmetria, formazione di vescicole) né lesioni del corion. Per la raccolta e la separazione delle uova, cfr. appendice 3, figure 1 e 3, e appendice 4, figura 2.

Distribuzione delle uova nelle piastre a 24 pozzetti

27. Si distribuiscono le uova nelle piastre a pozzetti come segue (cfr. anche appendice 4, figura 1):

— 20 uova per piastra per ciascuna concentrazione di prova;

— 20 uova in una piastra di controllo del solvente (se necessario);

— 20 uova in una piastra di controllo positivo (se necessario);

— 4 uova in ciascuna delle predette piastre come controllo interno dell'acqua di diluizione;

— 24 uova in una piastra di controllo negativo dell'acqua di diluizione.

Osservazioni

28. Gli endpoint apicali osservati in ciascun embrione sottoposto a prova sono: la coagulazione di embrioni, la mancata formazione dei somiti, il mancato distacco dell'abbozzo caudale e l'assenza di battito cardiaco (tabella 1). Queste osservazioni servono a determinare la letalità: il risultato positivo in una di esse indica il decesso dell'embrione di danio zebrato. Si registra inoltre la schiusa nei gruppi esposti e nei controlli ogni giorno a partire dalla 48[a] ora. Le osservazioni sono registrate ogni 24 ore fino al termine della prova.

Tabella 1

Osservazioni degli endpoint apicali di tossicità acuta negli embrioni di danio zebrato a 24-96 ore dalla fecondazione.

	Tempo di esposizione			
	24 ore	48 ore	72 ore	96 ore
Embrioni coagulati	+	+	+	+
Mancata formazione dei somiti	+	+	+	+
Mancato distacco dell'abbozzo caudale	+	+	+	+
Assenza di battito cardiaco		+	+	+

29. *Coagulazione degli embrioni:* gli embrioni coagulati sono di color bianco latteo e appaiono scuri al microscopio (cfr. appendice 5, figura 1). Si determina il numero di embrioni coagulati dopo 24, 48, 72 e 96 ore.

30. *Mancata formazione dei somiti:* a una temperatura di 26 (± 1) °C, nell'embrione di danio zebrato dallo sviluppo normale dopo 24 ore si formano circa 20 somiti (cfr. appendice 5, figura 2). In un embrione che si sviluppa normalmente si osservano movimenti spontanei (contrazioni), che indicano la formazione di somiti. Si registra l'assenza di somiti dopo 24, 48, 72 e 96 ore. La mancata formazione di somiti dopo 24 ore potrebbe essere dovuta a un ritardo generale dello sviluppo. Se al più tardi dopo 48 ore la formazione di somiti non è avvenuta, gli embrioni sono considerati morti.

31. *Mancato distacco dell'abbozzo caudale:* nell'embrione di danio zebrato dallo sviluppo normale il distacco dell'abbozzo caudale dal vitello (cfr. appendice

▼M7

5, figura 3) si osserva dopo l'allungamento posteriore dell'embrione. Si registra il mancato distacco dell'abbozzo caudale dopo 24, 48, 72 e 96 ore.

32. *Assenza di battito cardiaco:* a 26 (± 1)°C nell'embrione di danio zebrato dallo sviluppo normale il battito cardiaco è visibile dopo 48 ore (cfr. appendice 5, figura 4). La registrazione di questo endpoint richiede particolare attenzione: non è da considerarsi letale un battito irregolare (erratico) né un battito visibile senza circolazione nell'aorta addominale. Si registra l'assenza di battito cardiaco nell'embrione dopo un'osservazione di almeno un minuto con un ingrandimento minimo di 80x, La registrazione di questo endpoint va effettuata dopo 48, 72 e 96 ore.

33. Si registrano e si riportano nella relazione i tassi di schiusa di tutti i gruppi esposti e di controllo a partire dalla 48[a] ora. Sebbene non sia un endpoint utilizzato per il calcolo dell'LC_{50}, la schiusa fa sì che l'embrione sia esposto senza l'interposizione del corion, che può fungere da barriera; è pertanto un elemento che aiuta a interpretare i dati.

34. La descrizione dettagliata dello sviluppo normale (35) ed esempi di sviluppo anomalo degli embrioni di danio zebrato figurano nelle appendici 3 e 5.

Misurazioni analitiche

35. All'inizio e alla fine della prova si misurano il pH, la durezza totale e la conduttività nel/i controllo/i e nella concentrazione massima della sostanza chimica in esame. Nei sistemi semistatici il pH è misurato prima e dopo il rinnovo dell'acqua. La concentrazione dell'ossigeno disciolto è misurato alla fine della prova nei controlli negativi e nella concentrazione di prova massima con embrioni vitali e deve essere conforme ai criteri di validità della prova (cfr. il paragrafo 8, lettera f). Se si sospetta che la temperatura non sia uguale nelle varie piastre a 24 pozzetti, la si misura in tre recipienti selezionati a caso; di preferenza, si registra la temperatura in continuo durante la prova o almeno su base giornaliera.

36. In un sistema statico, si misura la concentrazione della sostanza chimica in esame almeno alle concentrazioni massima e minima, ma preferibilmente in tutti i recipienti di esposizione, all'inizio e alla fine della prova. Nelle prove semistatiche (con rinnovo) in cui si prevede che la concentrazione della sostanza chimica in esame non si discosti di oltre ± 20 % dai valori nominali, si raccomanda di analizzare almeno le concentrazioni di prova minima e massima appena preparate e subito prima del rinnovo. Per le prove in cui si prevede che la concentrazione della sostanza chimica in esame si discosti di ± 20 % dai valori nominali, si devono analizzare tutte le concentrazioni appena preparate e subito prima del rinnovo. Se il volume da analizzare è insufficiente può essere utile mescolare le soluzioni di prova o utilizzare recipienti sostitutivi dello stesso materiale e aventi lo stesso rapporto volume/superficie delle piastre a 24 pozzetti. È vivamente raccomandato che i risultati siano basati sulle concentrazioni misurate. Se le concentrazioni hanno valori compresi nell'intervallo 80-120 % della concentrazione nominale, le concentrazioni con effetto devono essere espresse in rapporto alla media geometrica delle concentrazioni misurate; per maggiori dettagli, cfr. il documento d'orientamento dell'OCSE sulle prove di tossicità in ambiente acquatico di sostanze o miscele difficili (28).

PROVA LIMITE

37. Usando le procedure descritte nel presente metodo di prova, si può eseguire una prova limite a 100 mg/l della sostanza chimica in esame oppure fino al limite di solubilità della stessa nel mezzo di prova (se è inferiore), allo scopo di dimostrare che l'LC_{50} si colloca al di sopra di questa concentrazione. Si allestisce la prova limite utilizzando 20 embrioni per l'esposizione alla sostanza chimica in esame, il controllo positivo e, se necessario, il controllo del solvente e 24 embrioni per il controllo negativo. Se la percentuale di letalità alla concentrazione saggiata è superiore del 10 % alla mortalità

▼M7

del controllo negativo (o del controllo del solvente), occorre effettuare uno studio completo. Si registrano tutti gli effetti osservati. Se la mortalità è superiore al 10 % nel controllo negativo (o nel controllo del solvente), la prova non è valida e deve essere ripetuta.

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

38. Ai fini dell'analisi statistica, in questa prova ogni pozzo è considerato una replica indipendente. Si traccia il grafico delle percentuali di embrioni per i quali l'osservazione di almeno uno degli endpoint apicali è positiva a 48 e/o 96 ore in funzione delle concentrazioni di prova. Per calcolare la pendenza della curva, i valori di LC_{50} e i limiti di confidenza (95 %) occorre applicare metodi statistici appropriati (38) e consultare il documento di orientamento dell'OCSE sugli approcci attuali all'analisi statistica dei dati sull'ecotossicità (39).

Relazione di prova

39. I seguenti dati devono figurare nella relazione di prova.

Sostanza chimica in esame

Sostanza monocostituente:

— caratteristiche fisiche, idrosolubilità e altre proprietà fisico-chimiche pertinenti;

— identificazione chimica, come denominazione IUPAC o CAS, numero CAS, codice SMILES o InChI, formula strutturale, purezza, identità chimica delle impurità, se opportuno e fattibile ecc. (compreso il tenore di carbonio organico, se del caso).

Sostanza multicostituente, sostanze UVCB e miscele:

— caratterizzazione, per quanto possibile, mediante l'identità chimica dei costituenti (vedi sopra), loro presenza quantitativa e loro proprietà fisico-chimiche pertinenti.

Organismi di prova:

— nome scientifico, ceppo, origine e metodo di raccolta delle uova fecondate e successiva manipolazione.

Condizioni sperimentali:

— procedura utilizzata (ad esempio, con rinnovo semistatico);

— fotoperiodo;

— disegno sperimentale (ad esempio, numero di recipienti di prova, tipo di controlli);

— caratteristiche di qualità dell'acqua nelle vasche di mantenimento dei pesci (ad esempio, pH, durezza, temperatura, conduttività, ossigeno disciolto);

— concentrazione dell'ossigeno disciolto, pH, durezza totale, temperatura e conduttività delle soluzioni di prova all'inizio e dopo 96 ore;

— metodo di preparazione delle soluzioni madre e delle soluzioni di prova, nonché frequenza di rinnovo;

▼M7

— giustificazione dell'utilizzo di un solvente e della scelta dello specifico solvente utilizzato (se diverso dall'acqua);

— concentrazioni di prova nominali e risultati di tutte le analisi effettuate per determinare la concentrazione della sostanza chimica in esame nei recipienti di prova, compreso l'efficienza di recupero del metodo e il limite di quantificazione (LoQ);

— dati comprovanti il rispetto dei criteri di validità della sopravvivenza complessiva nei controlli;

— tasso di fecondazione delle uova;

— tasso di schiusa nei gruppi esposti e nei controlli.

Risultati:

— concentrazione massima che non ha causato mortalità durante la prova;

— concentrazione minima che ha causato 100 % di mortalità durante la prova;

— mortalità cumulativa per ciascuna concentrazione nei momenti di osservazione raccomandati;

— valori dell'LC_{50} a 96 ore (e facoltativamente a 48 ore) per la mortalità con limiti di confidenza al 95 %, se possibile;

— grafico della curva concentrazione-mortalità alla fine della prova;

— mortalità nei controlli (controlli negativi, controlli interni, controllo positivo ed eventuale controllo del solvente);

— dati sull'esito dell'osservazione di ciascuno dei quattro endpoint apicali;

— incidenza e descrizione delle eventuali anomalie morfologiche e fisiologiche, se del caso (cfr. esempi forniti nell'appendice 5, figura 2);

— incidenti avvenuti nel corso della prova che potrebbero aver influito sui risultati;

— analisi statistica e trattamento dei dati (analisi probit, modello di regressione logistica e media geometrica per l'LC_{50});

— pendenza e limiti di confidenza del modello di regressione della curva (trasformata) concentrazione-risposta.

Deviazioni rispetto al metodo di prova e relative spiegazioni.

Discussione e interpretazione dei risultati

BIBLIOGRAFIA

(1) OECD (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Paris.

(2) OECD (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Paris.

(3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N. (2005) Towards an alternative for the acute

▼M7

fish LC_{50} test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: 87-102.

(4) ISO (2007) International Standard Water quality — Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.

(5) Nagel, R. (2002) DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) — a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.

(6) Schulte, C. and Nagel, R. (1994) Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test — preliminary results. ATLA 22, 12-19.

(7) Bachmann, J. (2002) Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Germany.

(8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. and Nagel, R. (1995) Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: 2087-2102.

(9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 9690-9700.

(10) Kammann, U., Vobach, M. and Wosniok, W. (2006) Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97-102.

(11) Groth, G., Kronauer, K. and Freundt, K.J. (1994) Effects of *N,N*-diemethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. *In Vitro* 8: 401-406.

(12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. and Freundt, K.J. (1993) Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 878-882.

(13) Nguyen, L.T. and Janssen, C.R. (2001) Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: 566-571.

(14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. and Wu, R.S.S. (2000) Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: 3024-3031.

(15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. and Carr G. J. (2013). Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 32: 1768-1783.

(16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), 196–209.

(17) Capitolo C.4 del presente allegato, Determinazione della «pronta» (ready) biodegradabilità.

(18) Capitolo C.29 del presente allegato, Pronta biodegradabilità — CO_2 in recipienti ermetici.

(19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: 25-36.

▼M7

(20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Reprod. Toxicol. 33: 133-141.

(21) Incardona, J.P, Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257: 242-249.

(22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. Toxicol. Appl. Pharmacol. 253: 244-252.

(23) Capitolo C.48 del presente allegato, Saggio di tossicità a breve termine sulla riproduzione di pesci. Cfr. appendice 4A.

(24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). Toxicol. *in vitro* 23: 1436-1442.

(25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001) Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35, 4097–4102.

(26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1676-1682.

(27) ISO (1996) International Standards. Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-through method. Available: [http://www.iso.org].

(28) OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.

(29) Laale, H.W. (1977) The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. J. Fish Biol. 10: 121-173.

(30) Westerfield, M. (2007) The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5th edition. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.

(31) Canadian Council on Animal Care (2005) Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf

(32) Commissione europea (2007), raccomandazione 2007/526/CE della Commissione, del 18 giugno 2007, relativa a linee guida per la sistemazione e la tutela degli animali impiegati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici (notificata con il numero C(2007) 2525) [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:IT:PDF]

(33) Unione europea (2010), 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);

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:IT:PDF

(34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: 173-181.

▼**M7**

(35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253-310.

(36) Capitolo C.2 del presente allegato, Saggio di immobilizzazione acuta in *Daphnia* sp.

(37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect conentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1970-1978

(38) ISO (2006) International Standard. Water quality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Available: [http://www.iso.org].

(39) OECD (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris.

(40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper «Fish embryo toxicity assays». UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. 298 pp.

▼M7

Appendice 1

DEFINIZIONI

Endpoint apicale: indicatore di effetti a livello della popolazione.

Blastula: formazione cellulare intorno al polo animale che ricopre una determinata parte del vitello.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Epibolia: proliferazione massiccia di cellule prevalentemente epidermiche nella fase di gastrulazione dell'embrione e loro spostamento dal lato dorsale verso quello ventrale mediante il quale gli strati cellulari entodermici si invaginano e il vitello si ritrova all'interno dell'embrione.

Prova a flusso continuo: prova nella quale le soluzioni saggiate scorrono nel sistema sperimentale con un flusso continuo durante il periodo di esposizione.

Controllo interno della piastra: controllo interno costituito, in una piastra a 24 pozzetti, da 4 pozzetti riempiti di acqua di diluizione al fine di individuare la contaminazione potenziale delle piastre causata dal fabbricante o dal ricercatore durante la procedura e ricercare eventuali effetti che possano influire sull'esito della prova (ad esempio, gradiente di temperatura).

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry — Unione internazionale di chimica pura e applicata.

Acqua di mantenimento: acqua in cui si allevano i pesci adulti.

Concentrazione letale mediana (LC_{50}): concentrazione della sostanza chimica in esame ritenuta letale per il 50 % degli organismi esposti nell'arco temporale della prova.

Prova con rinnovo semistatico: prova con un regolare rinnovo delle soluzioni di prova a cadenza prestabilita (ad esempio, ogni 24 ore).

SMILES: Simplified Molecular Input Line Entry Specification (notazione semplificata lineare delle molecole).

Somite: negli embrioni dei vertebrati, gruppo di cellule mesodermiche posto ai lati del tubo neurale da cui si svilupperanno il derma (dermatomo), i muscoli scheletrici (miotomo) e le vertebre (sclerotomo).

Prova statica: prova durante la quale le soluzioni di prova restano sempre inalterate.

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

UVCB: sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici.

▼M7

Appendice 2

MANTENIMENTO, RIPRODUZIONE E CONDIZIONI TIPO PER LE PROVE DI TOSSICITÀ ACUTA SUGLI EMBRIONI DI DANIO ZEBRATO

Danio zebrato (*Danio rerio*)		
Origine delle specie		India, Birmania, Malacca, Sumatra
Dimorfismo sessuale		Femmina: ventre prominente quando portano le uova Maschio: più sottile, di tonalità arancio tra le strisce blu longitudinali (particolarmente visibile nella pinna anale)
Regime alimentare		Fiocchi disidratati (max. 3 % del peso del pesce al giorno) 3-5 volte al giorno + naupli di artemia (*Artemia* sp.) e/o dafnie di dimensioni appropriate provenienti da fonte non contaminata. Il cibo vivo arricchisce l'ambiente e pertanto deve far parte, per quanto possibile, del regime alimentare. Per garantire una qualità dell'acqua ottimale si rimuovono il cibo non consumato e gli escrementi circa un'ora dopo la somministrazione del cibo.
Peso approssimativo del pesce adulto		Femmina: 0,65 ± 0,13 g Maschio: 0,5 ± 0,1 g
Mantenimento dei pesci riproduttori	Illuminazione	Lampadine fluorescenti (ad ampio spettro) 10-20 $\mu E/m^2/s$, 540-1 080 lux, o 50-100 ft-c (livelli ambientali di laboratorio); fotoperiodo: 12-16 ore
	Temperatura dell'acqua	26 (±1) °C
	Qualità dell'acqua	$O_2 \geq 80$ % del valore di saturazione, durezza: ad esempio, ~30-300 mg/l $CaCO_3$, NO_3^-: ≤48mg/l, NH_4^+ e NO_2^-: < 0,001 mg/l, cloro residuo <10 µg/l, cloro organico totale < 25 ng/l, pH = 6,5 — 8,5
	Altri criteri di qualità dell'acqua	Particolato <20 mg/l, carbonio organico totale < 2 mg/l, pesticidi organofosforati totali < 50 ng/l, pesticidi organoclorurati totali + difenili policlorurati < 50 ng/l
	Dimensioni delle vasche di mantenimento	180 l, 1 pesce/l, ad esempio
	Depurazione dell'acqua	Permanente (con filtri a carbone); altre possibilità: combinazione con sistemi di mantenimento a rinnovo semistatico o a flusso continuo con rinnovo costante dell'acqua
	Rapporto maschi/femmine raccomandato per la riproduzione	2:1 (o riproduzione di massa)
Vasche di riproduzione		Ad esempio vasche da 4 l munite di fondo con griglia in acciaio e piante artificiali come stimolo di riproduzione; tappetini riscaldanti esterni, o riproduzione di massa all'interno delle vasche di mantenimento
Struttura e aspetto delle uova		Corion stabile (ossia, molto trasparente, non colloso, diametro ~ 0,8-1,5 mm)
Tasso di riproduzione		Una femmina matura produce almeno 50-80 uova al giorno. In alcuni ceppi questo tasso può essere molto più alto. Il tasso di fecondazione deve essere ≥70 %. Nei pesci che si riproducono per la prima volta, il tasso di fecondazione delle uova può essere inferiore nei primi cicli.
Tipo di prova		Statica, semistatica con rinnovo, a flusso continuo, 26 (± 1) °C, recipienti di prova condizionati per 24 ore (ad esempio, piastre a 24 pozzetti di capienza 2,5-5 ml/pozzetto)

▼M7

Appendice 3

SVILUPPO NORMALE DEL DANIO ZEBRATO A 26 °C

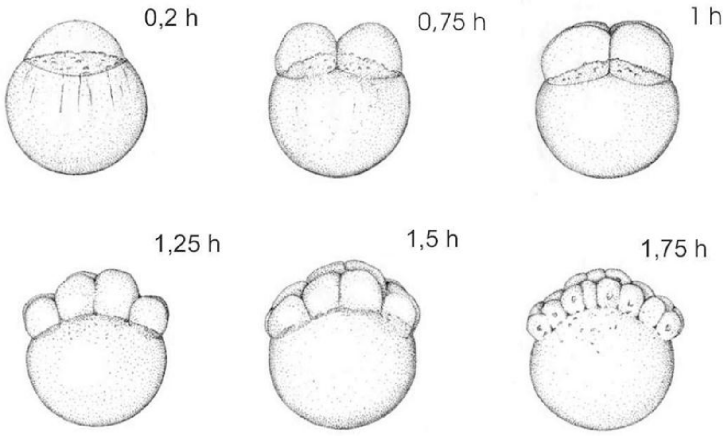


Figura 1 — Alcuni stadi iniziali dello sviluppo del danio zebrato (Danio rerio): 0,2-1,75 ore dopo la fecondazione (Kimmel *et al*., 1995 (35)). Per diagnosticare la fecondazione e la vitalità delle uova è utile basarsi sulla cronologia di uno sviluppo normale (cfr. paragrafo 26, Selezione delle uova fecondate).

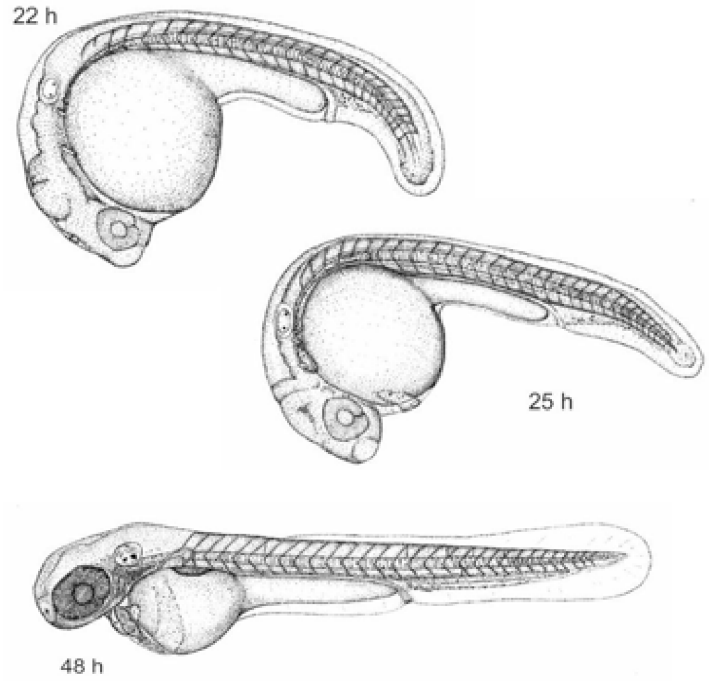


Figura 2 — Alcuni stadi posteriori dello sviluppo del danio zebrato (*Danio rerio*) (embrione privo del corion per ottimizzare la visibilità): 22 — 48 ore dopo la fecondazione (Kimmel *et al*., 1995 (35)).

▼M7

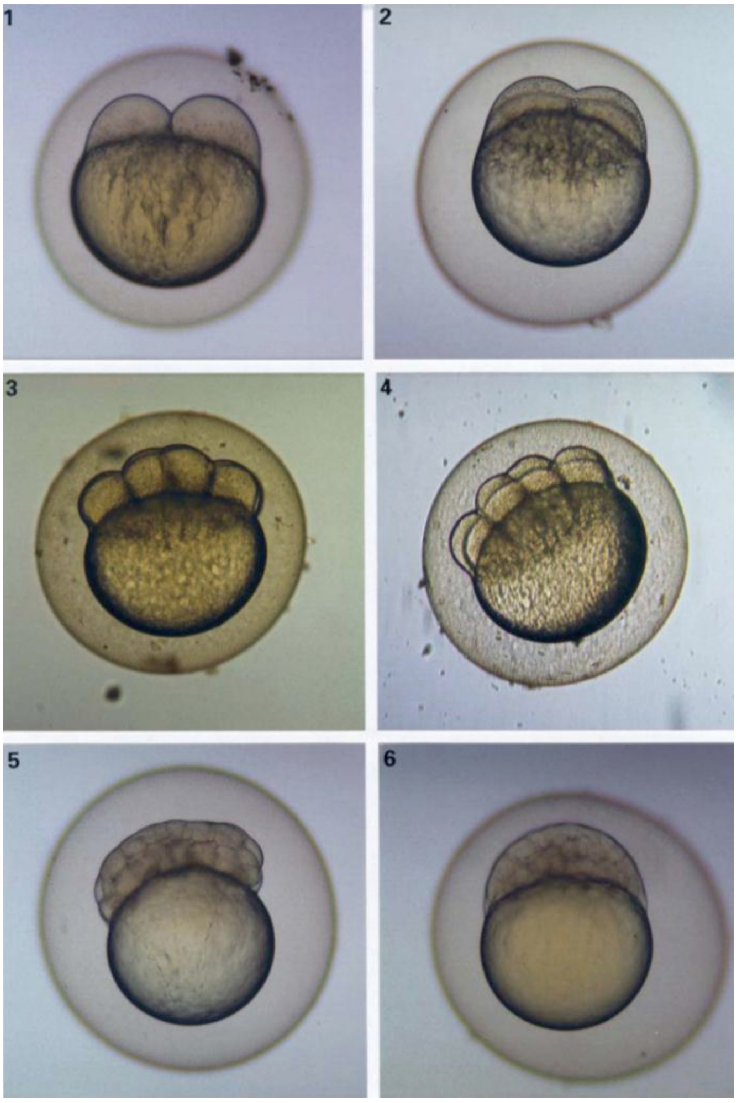


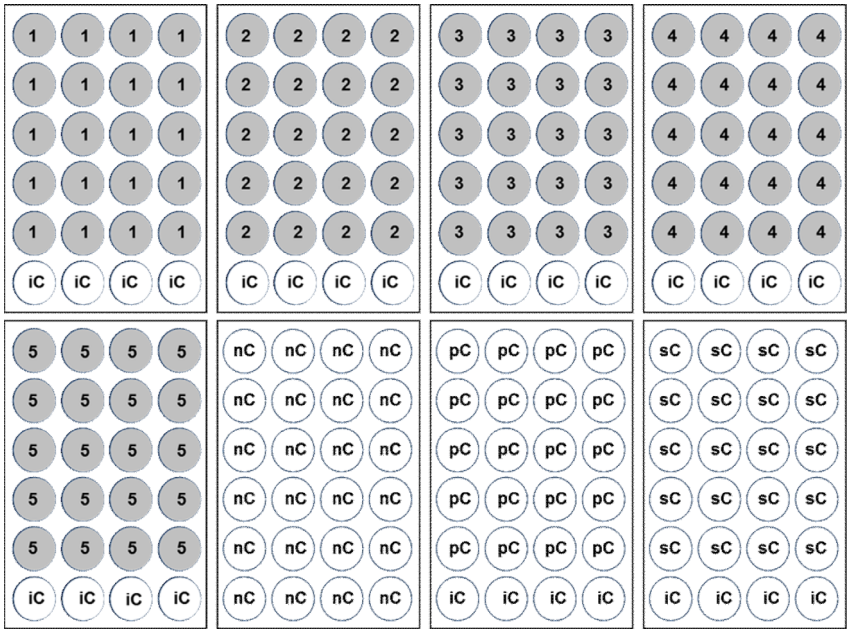
Figura 3 — Sviluppo normale di embrioni di danio zebrato (Danio rerio): (1) 0,75 ore, stadio a 2 cellule; (2) 1 ora, stadio a 4 cellule; (3) 1,2 ore, stadio a 8 cellule; (4) 1,5 ore, stadio a 16 cellule; (5) 4,7 ore, inizio dell'epibolia; (6) 5,3 ore, epibolia al 50 % circa (Braunbeck & Lammer 2006 (40)).

▼**M7**

Appendice 4

Figura 1

Allestimento delle piastre a 24 pozzetti



1-5 = cinque concentrazioni di prova/sostanza chimica;

nc = controllo negativo (acqua di diluizione);

iC = controllo interno della piastra (acqua di diluizione);

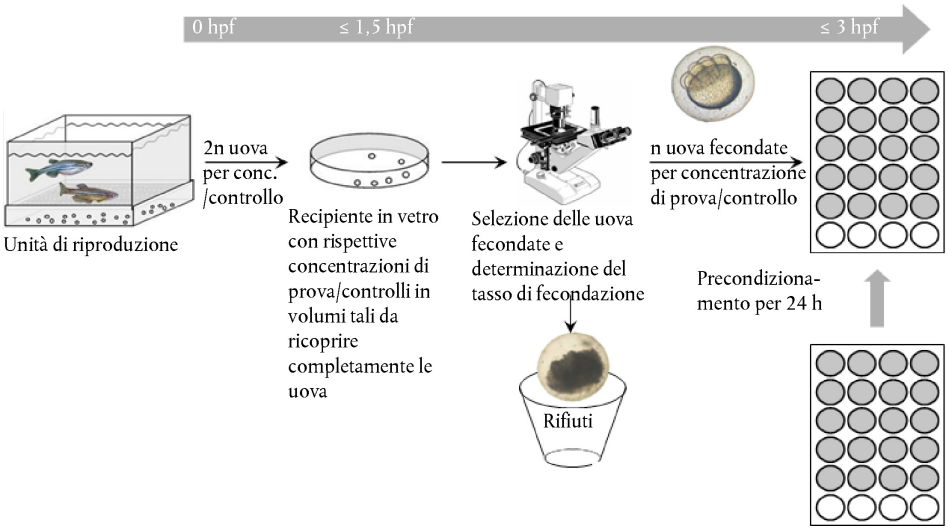
pC = controllo positivo (3,4-DCA 4 mg/l);

sC = controllo del solvente

▼M7

Figura 2

Schema della procedura sperimentale di tossicità acuta sugli embrioni di Danio zebrato (da sinistra a destra): produzione delle uova, raccolta delle uova, pre-esposizione subito dopo la fecondazione in recipienti di vetro, selezione delle uova fecondate con un microscopio rovesciato o un binoculare e distribuzione delle uova fecondate nelle piastre a 24 pozzetti preparate con le rispettive concentrazioni di prova/controlli, n = numero di uova necessarie per ogni concentrazione di prova/controllo (in questo caso 20), hpf = ore trascorse dalla fecondazione



▼M7

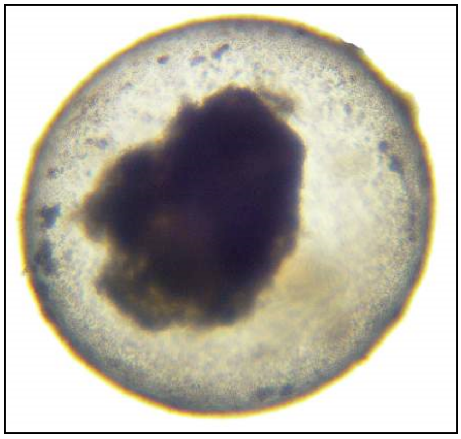
Appendice 5

ATLANTE DEGLI ENDPOINT LETALI PER LA PROVA DI TOSSICITÀ ACUTA SUGLI EMBRIONI DI DANIO ZEBRATO

I seguenti endpoint apicali indicano tossicità acuta e, di conseguenza, il decesso degli embrioni: *coagulazione dell'embrione, mancato distacco dell'abbozzo caudale, mancata formazione dei somiti e assenza di battito cardiaco*. Per illustrarli sono state selezionate le seguenti micrografie.

Figura 1

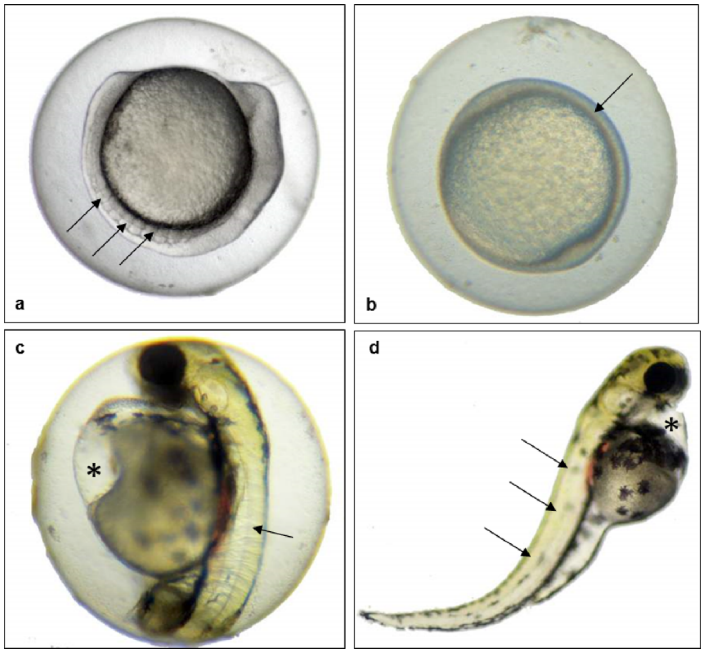
Coagulazione dell'embrione:



con illuminazione a campo chiaro si distingue una serie di inclusioni opache negli embrioni coagulati di danio zebrato.

Figura 2

Mancata formazione dei somiti:

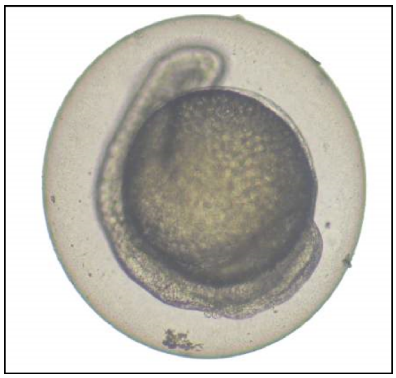


▼M7

malgrado il ritardo di sviluppo di circa 10 ore, l'embrione di danio zebrato di 24 ore in (a) presenta somiti ben sviluppati (→), mentre l'embrione in (b) non presenta alcun segno di formazione di somiti (→). Si osserva la netta formazione di somiti (→) nell'embrione di danio zebrato di 48 ore in (c), nonostante un edema pronunciato del sacco vitellino (*), mentre l'embrione di danio zebrato di 96 ore in (d) non presenta alcun segno di formazione di somiti (→). Si noti anche in (d) la deviazione della colonna vertebrale (scoliosi) e l'edema pericardico (*).

Figura 3

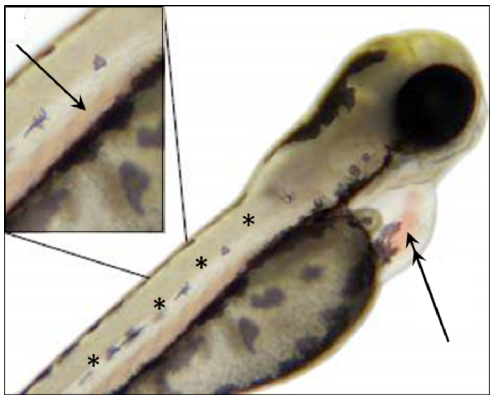
Vista laterale del mancato distacco dell'abbozzo caudale



(a: →; embrione di danio zebrato di 96 ore). Si osservi anche l'assenza di abbozzo oculare (*).

Figura 4

Assenza di battito cardiaco



L'assenza di battito cardiaco è, per ovvie ragioni, difficile da illustrare in una micrografia. La non convulsione del cuore (doppia freccia) indica l'assenza di battito cardiaco. L'immobilità delle cellule ematiche, ad esempio nell'aorta addominale (→ nel riquadro) non è un indicatore dell'assenza di battito cardiaco. Si osservi anche la mancata formazione dei somiti in questo embrione (*, aspetto omogeneo anziché segmentale dei tessuti muscolari). Il tempo di osservazione per la registrazione dell'assenza di battito cardiaco deve essere di almeno un minuto con un ingrandimento minimo di 80×.

▼M7

C.50. PROVA DI TOSSICITÀ SU *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* IN UN SISTEMA DI PROVA SENZA SEDIMENTO

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 238 (2014) ed è inteso a valutare la tossicità delle sostanze chimiche su *Myriophyllum spicatum*, una specie di piante acquatiche sommerse della classe delle dicotiledoni, del genere delle millefoglie d'acqua. Il metodo si basa su un metodo di prova dell'ASTM (1), modificato per essere basato su un sistema di prova senza sedimento (2) al fine di valutare l'ecotossicità intrinseca delle sostanze chimiche in esame (indipendentemente dal modo in cui tali sostanze chimiche in esame si distribuiscono tra acqua e sedimento). Un sistema di prova senza sedimento presenta una modesta complessità analitica (solamente nella fase acquosa) e i risultati possono essere analizzati in parallelo e/o confrontandoli con quelli ottenuti nella prova su *Lemna sp.* (3). Le condizioni che impongono un ambiente sterile consentono inoltre di limitare al minimo gli effetti di microorganismi e alghe (assorbimento chimico/degradamento, ecc.). La presente prova non sostituisce altre prove di tossicità acquatica, ma è volta piuttosto a integrarle per consentire una maggiore completezza della valutazione del pericolo e dei rischi per la flora acquatica. Il metodo di prova qui proposto è stato validato da una prova interlaboratorio (4).

2. Sono descritte dettagliatamente le procedure con rinnovo (procedura semistatica) e senza rinnovo (procedura statica) della soluzione di prova. In funzione degli obiettivi della prova e delle prescrizioni normative si raccomanda l'uso di metodi semistatici, ad esempio per le sostanze che spariscono rapidamente dalla soluzione per volatilizzazione, assorbimento, fotodegradazione, idrolisi, precipitazione o biodegradazione. Ulteriori orientamenti sono contenuti nel riferimento (5). Il presente metodo di prova si applica alle sostanze, per le quali il metodo è stato validato (per maggiori dettagli si rimanda alla relazione sulla prova interlaboratorio (4)), o alle formulazioni o a miscele conosciute. Nelle prove relative a miscele è opportuno individuarne e quantificarne il più possibile i costituenti. Il metodo di prova su *Myriophyllum spicatum* in un sistema di prova senza sedimento è complementare rispetto alla prova di tossicità su *Myriophyllum spicatum* in un sistema di prova acqua-sedimento (6). Prima dell'uso del metodo di prova su una miscela, per la generazione di dati per un determinato scopo normativo, occorre esaminare se, e in caso affermativo perché, può fornire risultati adeguati a tale scopo. Tali considerazioni non sono necessarie in presenza di un obbligo normativo di prova sulla miscela.

PRINCIPIO DELLA PROVA

3. Le colture di *Myriophyllum spicatum* a crescita costante (unicamente in un mezzo di prova di Andrews modificato, cfr. appendice 2) sono messe in condizione di crescere come monocolture a diverse concentrazioni della sostanza chimica in esame per un periodo di 14 giorni nel quadro di un sistema di prova senza sedimento. 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 misurazione. Tali variabili sono la crescita della lunghezza dei germogli, dei rami laterali e delle radici nonché l'evoluzione del peso fresco e secco e l'aumento del numero di verticilli. La prova tiene inoltre conto delle modifiche qualitative specifiche negli organismi di prova, come malformazioni o clorosi e necrosi indicate da un ingiallimento o da una colorazione bianca o marrone. Per quantificare gli effetti della sostanza chimica, si confronta la crescita nelle soluzioni di prova con quella nei controlli e si determina la concentrazione che causa una data percentuale di inibizione della crescita, espressa come EC_x, dove «x» può corrispondere a qualsiasi valore prescritto dal quadro regolamentare, ad es. EC_{10}, EC_{20}, EC_{50}. Va notato che le stime dei valori di EC_{10} ed EC_{20} sono affidabili e idonee solo nelle prove in cui i coefficienti di variazione per le piante di controllo sono inferiori al livello di effetto stimato, pertanto per un valore EC_{20} i coefficienti di variazione dovrebbero rimanere al di sotto del 20 %.

4. È opportuno determinare il tasso di crescita specifico medio (stimato in base alla lunghezza del germoglio principale e alla misurazione di tre ulteriori variabili) e il rendimento (stimato in base alla crescita della lunghezza del germoglio principale e alla misurazione di tre ulteriori variabili) delle piante

▼M7

trattate e non trattate. Di conseguenza il tasso di crescita specifico (r — *rate*) e il rendimento (y — *yield*) sono usati per determinare, rispettivamente, il valore E_rC_x (ad es. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) e il valore E_yC_x (ad es. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}).

5. Inoltre la concentrazione minima a cui si osserva un effetto statisticamente significativo (LOEC) e la concentrazione senza effetti osservabili (NOEC) possono essere determinate mediante un calcolo statistico.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA CHIMICA IN ESAME

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

7. È particolarmente importante regolare il pH del mezzo di prova, ad es. quando si saggiano metalli o sostanze chimiche idroliticamente instabili. Un documento di orientamento OCSE (5) fornisce ulteriori orientamenti per saggiare sostanze chimiche le cui proprietà fisico-chimiche rendono difficile la conduzione delle prove.

VALIDITÀ DELLA PROVA

8. Affinché la prova sia considerata valida, è necessario che la lunghezza del germoglio principale nel controllo sia almeno raddoppiata in meno di 14 giorni. Utilizzando il mezzo e le condizioni di prova descritti nel metodo di prova, questo criterio può essere soddisfatto utilizzando una procedura sperimentale statica o semistatica.

9. Nelle colture di controllo, il coefficiente di variazione medio del rendimento basato sulle misurazioni del peso fresco del germoglio (ossia tra l'inizio e la fine della prova) e le altre variabili di misurazione (cfr. paragrafo 37) non deve superare il 35 % tra le repliche.

10. Oltre il 50 % delle repliche del gruppo di controllo devono restare sterili nel corso del periodo di esposizione di 14 giorni, ossia non devono essere osservabili contaminazioni da parte di altri organismi come alghe, funghi e batteri (la soluzione deve essere limpida). *Nota:* La relazione sulla prova interlaboratorio (4) fornisce indicazioni sulle modalità di valutazione della sterilità.

SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

11. La procedura sperimentale può essere verificata saggiando sostanze chimiche di riferimento, come per esempio il 3,5-diclorofenolo utilizzato nella prova interlaboratorio (4). Sulla base dei risultati della prova interlaboratorio, i valori medi di EC_{50} del 3,5-diclorofenolo per le diverse variabili di risposta (cfr. paragrafi 37-42 del presente metodo di prova) sono compresi tra 3,2 mg/l e 6,9 mg/l (per i dettagli sull'intervallo di confidenza per tali valori si rimanda alla relazione sulla prova interlaboratorio). 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.

▼M7

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiature

12. 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 esenti da contaminanti chimici che potrebbero penetrare nel mezzo di prova e devono essere sterili. I recipienti di prova devono essere abbastanza alti da consentire al germoglio nei recipienti di controllo di crescere nella fase acquatica senza raggiungere la superficie del mezzo di prova a fine prova. Si consiglia di utilizzare dei tubi di prova in vetro al borosilicato con pareti spesse e bordi lisci, con un diametro interno di circa 20 mm e un'altezza di circa 250 mm, con tappi in alluminio.

13. Visto che il mezzo di prova di Andrews modificato contiene saccarosio (che stimola la crescita di funghi e batteri), le soluzioni di prova vanno preparate in condizioni sterili. Tutti i liquidi e tutta l'attrezzatura sono sterilizzati prima dell'uso. La sterilizzazione avviene tramite un trattamento termico ad aria calda (210°C) dalla durata di 4 ore o in autoclave per 20 minuti a 121°C. Inoltre, tutti i matracci, le piastre, le ciotole, ecc. e le altre attrezzature sono sottoposti a trattamento a fiamma su un piano di lavoro sterilizzato immediatamente prima dell'uso.

14. Le colture e i recipienti di prova non devono essere tenuti insieme; è quindi opportuno utilizzare camere di crescita ambientali, incubatori o locali separati. L'illuminazione e la temperatura devono essere regolabili e mantenute ad un livello costante.

Organismo sperimentale

15. Il *Myriophyllum spicatum* è una specie di piante acquatiche sommerse della classe delle dicotiledoni, del genere delle millefoglie d'acqua. Tra giugno e agosto produce fiori non molto appariscenti di color rosa-bianco che emergono sulla superficie dell'acqua. Le radici delle piante sono ancorate al suolo con un sistema di rizomi robusti. Queste piante crescono nell'intero emisfero boreale in acque stagnanti eutrofiche ma non inquinate e con un tenore di calcio piuttosto elevato, con un substrato fangoso. Il *Myriophyllum spicatum* predilige l'acqua dolce, ma cresce anche in acque salmastre.

16. Per la prova di tossicità in un sistema di prova senza sedimento è necessario usare piante sterili. Se il laboratorio di prova non dispone già di colture di *Myriophyllum spicatum*, può reperire il materiale vegetale sterile presso un altro laboratorio, può prelevarne degli esemplari (non sterili) in natura oppure ancora procurarseli sul mercato. Se tali piante sono prelevate in natura, è necessario procedere a una verifica tassonomica della specie. Nel caso di reperimento in natura o di acquisizione sul mercato, le piante devono essere sterilizzate (1) e tenute nello stesso mezzo che sarà utilizzato per le prove per almeno otto settimane prima dell'utilizzo. Le colture di partenza reperite in natura possono essere prelevate solo in siti chiaramente esenti da fonti evidenti di inquinamento. In occasione dei prelievi in natura, è necessario procedere con la massima cura per scegliere la specie desiderata, in particolare nelle regioni in cui sussiste il rischio di formazione di ibridi con altre specie di *Myriophyllum.* Se le colture provengono da un altro laboratorio, devono essere tenute in condizioni analoghe per almeno tre settimane. La fonte del materiale vegetale e la specie utilizzata per la prova devono sempre essere indicate.

17. La qualità e l'uniformità delle piante utilizzate per la prova avranno un impatto significativo sui risultati della stessa e le piante dovrebbero pertanto essere selezionate con cura. Occorre utilizzare piante giovani, in rapida crescita, prive di lesioni visibili e di parti scolorite (clorosi). Una descrizione generale dell'organismo di prova è contenuta nell'appendice 4.

Colture

18. Per ridurre la frequenza degli interventi per il mantenimento delle colture (ad esempio, se per un certo periodo, non si prevedono prove su *Myriophyllum*), le colture possono essere conservate ad un'illuminazione e una temperatura ridotte ((50 $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$, 20 ± 2 °C).). Informazioni dettagliate sulla coltura sono riportate nell'appendice 3.

▼M7

19. Almeno in un periodo compreso tra i 14 e i 21 giorni prima della prova, un numero sufficiente di organismi di prova è trasferito in modo asettico in un nuovo mezzo sterile e coltivato per un periodo da 14 a 21 giorni nelle condizioni previste per la prova, a titolo di pre-coltura. Informazioni dettagliate sulla preparazione di una pre-coltura sono riportate nell'appendice 4.

Mezzo di prova

20. Si raccomanda l'uso di un solo mezzo nutritivo per il *Myriophyllum spicatum* in un sistema di prova senza sedimento, come descritto nell'appendice 2. Si raccomanda di modificare il mezzo di prova di Andrews per la coltura del *Myriophyllum spicatum* e per le prove su tale specie, conformemente alle indicazioni di cui al riferimento (1). Il mezzo di prova di Andrews modificato è ottenuto utilizzando cinque soluzioni madre con l'aggiunta di saccarosio (3 %). Informazioni dettagliate sulla preparazione del mezzo sono riportate nell'appendice 2.

21. Per ottenere le soluzioni di prova (se opportuno, con diluizione) è necessario un mezzo di prova di Andrews modificato con una concentrazione decuplicata. La composizione di questo mezzo è riportata all'appendice 2.

Soluzioni di prova

22. Le soluzioni di prova sono generalmente preparate mediante diluizione di una soluzione madre. Le soluzioni madre della sostanza chimica in esame sono solitamente preparate sciogliendo la sostanza chimica in acqua demineralizzata (ossia distillata o deionizzata). Il mezzo di prova di Andrews modificato con concentrazione decuplicata consente di aggiungere nutrienti.

23. Le soluzioni madre della sostanza chimica in esame possono essere sterilizzate in autoclave a 121 °C per 20 minuti o con sterilizzazione mediante filtrazione, a condizione che la tecnica di sterilizzazione impiegata non modifichi la natura della sostanza chimica in esame. Le soluzioni di prova possono anche essere preparate in acqua demineralizzata o in un mezzo demineralizzato, in condizioni sterili. Nella scelta della procedura di sterilizzazione delle soluzioni madre della sostanza chimica in esame si dovrà tenere conto della termostabilità e dell'assorbimento su diverse superfici. Per questo motivo si raccomanda che le soluzioni madre siano preparate in condizioni sterili, ossia usando materiali sterili per dissolvere in acqua sterile la sostanza chimica in esame in condizioni sterili (ad es. tramite flambaggio o cappa a flusso laminare). Questa tecnica di preparazione delle soluzioni madre sterili si applica sia alle sostanze, sia alle miscele.

24. La concentrazione più elevata della sostanza chimica in esame non deve di norma superarne il limite di solubilità in acqua, nelle condizioni di prova. 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 tali materiali. Non si deve verificare una fitotossicità dovuta a solventi o disperdenti. Tra i solventi di uso comune che non provocano fitotossicità a concentrazioni fino a 100 µl/l 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 $\leq$ 100 µl/l); deve inoltre essere identica in tutti i recipienti trattati e di controllo. Ulteriori informazioni sull'uso dei disperdenti sono riportate al riferimento (5).

Gruppi sperimentali e gruppi di controllo

25. Per determinare le concentrazioni sperimentali adeguate è utile conoscere già la tossicità della sostanza chimica in esame nei confronti del *Myriophyllum spicatum*, per esempio sulla base di precedenti prove a diversi intervalli di concentrazione. La prova di tossicità definitiva dovrebbe di norma prevedere da cinque (analogamente alla prova di inibizione della crescita di specie *Lemna*, trattata nel capitolo C.26 del presente allegato) a sette concentrazioni di prova che formino

▼M7

una serie geometrica. Le concentrazioni dovrebbero essere scelte facendo sì che i valori NOEC e EC_{50} siano compresi nell'intervallo delle concentrazioni di prova (cfr. infra). 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 realizzare almeno cinque repliche per ogni concentrazione.

26. Nel fissare l'intervallo delle concentrazioni di prova (per determinare l'intervallo e/o la prova di tossicità finale), occorre tenere presente quanto segue:

per determinare il valore EC_x, le concentrazioni di prova devono includere il valore EC_x per garantire un intervallo di confidenza adeguato. Ad esempio, quando si valuta il valore EC_{50}, la concentrazione di prova più elevata deve essere superiore al valore EC_{50}. Se il valore EC_{50} si situa al di 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 la valutazione della LOEC/NOEC, la concentrazione di prova più bassa deve essere sufficientemente contenuta per far sì che la sua crescita non sia notevolmente inferiore a quella dei controlli. Inoltre la concentrazione di prova più elevata deve essere sufficientemente alta per far sì che la sua crescita sia significativamente inferiore a quella del controllo. 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, ad esempio 100 mg/l).

27. Ciascuna prova deve prevedere gli stessi controlli senza la sostanza chimica in esame, ma identici in termini di mezzo nutritivo, organismo di prova (scegliendo il materiale vegetale più omogeneo possibile, rami laterali freschi delle pre-colture, accorciate a 2,5 cm dalla base), e le condizioni e procedure ambientali dei recipienti di prova. 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 di prova contenenti la sostanza chimica in esame. Devono essere previsti almeno dieci recipienti di controllo per le repliche (e recipienti che contengono il solvente, se del caso).

28. 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 occorre prevedere almeno dieci repliche di controllo.

Esposizione

29. I rami laterali freschi della pre-coltura accorciati a 2,5 cm dalla base sono ripartiti a random tra i recipienti di prova in condizioni asettiche. Ciascun recipiente di prova deve contenere un ramo laterale da 2,5 cm che presenti un meristema apicale a un'estremità. Il materiale vegetale scelto deve avere la stessa qualità in ciascun recipiente di prova.

30. La disposizione dei recipienti di prova nell'incubatore deve essere casuale per ridurre al minimo l'impatto delle differenze spaziali di intensità di luce o di temperatura. Anche quando si effettuano le osservazioni è necessaria una disposizione dei recipienti secondo un piano in blocchi o una disposizione casuale (o un riposizionamento più frequente).

31. Se una prova di stabilità preliminare indica che nel corso della prova (14 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 piante a soluzioni di prova e di controllo nuove almeno una volta durante la prova

▼M7

(per esempio, il 7° giorno). La frequenza dell'esposizione al nuovo mezzo 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.

32. L'esposizione mediante un'applicazione fogliare (polverizzazione) non è contemplata nel presente metodo di prova.

Condizioni di prova

33. Occorre utilizzare un'illuminazione a fluorescenza bianca, calda o fredda, al fine di ottenere un'intensità luminosa tra 100 e 150 μE m^{-2} s^{-1} misurata in termini di radiazione fotosinteticamente attiva (400-700 nm) in punti equidistanti dalla fonte di luce, ad esempio il fondo dei recipienti di prova (equivalente a circa 6 000 — 9 000 lux) e con un ciclo luce-buio di 16:8 ore. Il metodo di individuazione e misurazione della luce, in particolare il tipo di sensore, influenzeranno il valore misurato. I sensori sferici (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 al di sopra del piano di misurazione) sono preferibili ai sensori unidirezionali e indicheranno valori più elevati per una fonte luminosa multipla come quella qui descritta.

34. La temperatura dei recipienti di prova è pari a 23 (± 2) °C. Occorre prestare particolare attenzione alle variazioni del pH, in particolare quando si saggiano sostanze chimiche instabili e metalli. Il pH dovrà rimanere in un intervallo tra 6 e 9. Cfr. il riferimento (5) per indicazioni supplementari in materia.

Durata

35. La prova termina 14 giorni dopo il trasferimento delle piante nei recipienti di prova.

Misure e determinazioni analitiche

36. All'inizio della prova la lunghezza del germoglio principale dell'organismo di prova è pari a 2,5 cm (cfr. il paragrafo 29). Le misurazioni sono effettuate con un righello (cfr. appendice 4) o tramite fotografie e analisi delle immagini. La lunghezza del germoglio principale, indipendentemente dall'apparenza normale o anormale, va determinata all'inizio della prova, almeno una volta durante il periodo di esposizione di 14 giorni e fine prova. Nota: per i laboratori che non possono eseguire un'analisi delle immagini, se il piano di lavoro è sterilizzato prima dell'aggiunta di piante ai recipienti di prova, per la misurazione della lunghezza del germoglio principale all'inizio e alla fine della prova può essere usato anche un righello sterile. Occorre prendere nota delle modifiche nello sviluppo delle piante per quanto riguarda, per esempio, le deformazioni dei germogli, i segni di necrosi, clorosi, la frammentazione o diminuzione della galleggiabilità nonché la lunghezza e l'aspetto delle radici. Occorre prendere nota anche delle caratteristiche salienti del mezzo di prova (per esempio la presenza di materie non disciolte, lo sviluppo di alghe, funghi e batteri nel recipiente di prova).

37. Durante le prova, oltre a determinare la lunghezza del germoglio principale, si valutano gli effetti della sostanza chimica in esame su tre (o più) delle seguenti variabili di misurazione:

i. lunghezza totale dei rami laterali

ii. lunghezza totale del germogli

iii. lunghezza totale delle radici

iv. peso fresco

v. peso secco

vi. numero di verticilli

▼M7

Nota 1: le osservazioni effettuate nel quadro della prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni possono contribuire a scegliere di misurare ulteriori variabili pertinenti tra le sei variabili sopraelencate.

Nota 2: è altamente raccomandato di determinare il peso fresco e secco (parametri iv e v).

Nota 3: poiché il saccarosio e la luce (esposizione delle radici alla luce nel corso della prova) possono incidere sui vettori che trasportano l'auxina (ormone della crescita delle piante) e poiché alcune sostanze chimiche hanno modalità di azione simili a quelle delle auxine, l'interesse di misurare gli effetti sulle radici (parametro iii) è discutibile.

Nota 4: i risultati della prova interlaboratorio evidenziano elevati coefficienti di variazione (> 60 %) per la lunghezza totale dei rami laterali (parametro i). In ogni caso la lunghezza totale dei rami laterali è compresa nella misurazione della lunghezza totale dei germogli (parametro ii), per cui i coefficienti di variazione sono più accettabili (< 30 %).

Nota 5: in base alle considerazioni sopraesposte, gli endpoint di misurazione principali raccomandati sono: lunghezza totale dei germogli, peso fresco e peso secco (parametri ii, iv e v). La considerazione del parametro vi, ossia il numero di verticilli, è lasciata alla discrezione dell'operatore.

38. La lunghezza del germoglio principale e il numero di verticilli presentano il vantaggio di poter essere determinati per ciascun recipiente di prova e di controllo all'inizio, durante e a fine prova con fotografie e analisi delle immagini, sebbene possa essere usato anche un righello (sterile).

39. La lunghezza totale dei verticilli, la lunghezza totale delle radici (come somma di tutti i verticilli o radici laterali) e la lunghezza totale dei germogli (come somma della lunghezza del germoglio principale e lunghezza totale dei rami laterali) possono essere misurate con un righello a fine esposizione.

40. Il peso fresco e/o secco è stabilito all'inizio della prova da un campione della pre-coltura rappresentativo del materiale utilizzato per avviare la prova e a fine prova con il materiale vegetale di ciascun recipiente di prova e di controllo.

41. La lunghezza totale dei rami laterali, la lunghezza totale dei germogli, la lunghezza totale delle radici, il peso fresco, il peso secco e il numero di verticilli possono essere determinati come segue:

    i. lunghezza totale dei rami laterali: la lunghezza dei rami laterali può essere determinata misurando tutti i rami laterali con un righello a fine esposizione. La lunghezza totale dei rami laterali è la somma di tutti i rami laterali in ciascuna prova e in ciascun recipiente di prova e di controllo;

    ii. lunghezza totale dei germogli: la lunghezza del germoglio principale può essere determinata tramite analisi delle immagini o con un righello. La lunghezza totale dei germogli è la somma della lunghezza totale dei rami laterali e della lunghezza del germoglio principale in ciascun recipiente di prova e di controllo a fine esposizione;

    iii. lunghezza totale delle radici: la lunghezza delle radici può essere determinata misurando tutte le radici con un righello a fine esposizione. La lunghezza totale delle radici è la somma della lunghezza di tutte le radici in ciascun recipiente di prova e di controllo;

    iv. peso fresco: il preso fresco può essere determinato pesando l'organismo di prova a fine esposizione. Tutto il materiale vegetale di ciascun recipiente di prova e di controllo sarà sciacquato con acqua distillata e

▼M7

asciugato tamponandolo con carta di cellulosa. Alla fine di questa procedura di preparazione il peso fresco può essere ottenuto mediante pesatura. La biomassa di partenza (peso fresco) è determinata a partire da un campione di germogli prelevato dallo stesso lotto utilizzato per inoculare i recipienti di prova;

v. peso secco: in seguito alla procedura di preparazione per la determinazione del peso fresco, gli organismi di prova sono seccati a 60°C fino a raggiungere un peso costante. Questa massa corrisponde al peso secco. La biomassa di partenza (peso secco) è determinata a partire da un campione dell'organismo di prova prelevato dallo stesso lotto utilizzato per inoculare i recipienti di prova;

vi. numero di verticilli: Vanno contati tutti i verticilli sul germoglio principale.

Frequenza delle misurazioni e determinazioni analitiche

42. Se si applica una procedura statica, il pH di ciascun recipiente trattato deve essere misurato a inizio e a fine 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 equidistanti dalla fonte luminosa rispetto agli organismi di prova. Tali misurazioni devono essere effettuate almeno una volta nel corso della prova. La temperatura del mezzo è misurata almeno una volta al giorno (o in via continuativa con un *data logger*, ossia un registratore di dati) in un recipiente di prova appositamente allestito per questo scopo e conservato nelle stesse condizioni degli altri nella camera di crescita, nell'incubatore o nella stanza.

44. Durante la prova, le concentrazioni della o delle sostanze chimiche in esame sono determinate a congrui intervalli. Nelle prove statiche, le concentrazioni devono essere rilevate almeno a inizio e a fine prova.

45. Nelle prove semistatiche in cui si presume che le concentrazioni della sostanza chimica in esame non si mantengano entro un intervallo di ± 20 % della concentrazione nominale è necessario analizzare tutte le soluzioni di prova appena vengono preparate e al momento di ciascun rinnovo. Tuttavia, per le prove in cui le concentrazioni della sostanza chimica in esame misurata inizialmente non si situano in un intervallo di ± 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 l'80 % e il 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 oggetto di prova prima del rinnovo deve essere effettuata su un solo recipiente identico per ciascuna concentrazione di prova (o in un recipiente in cui si sarà mescolato il contenuto di tutti i recipienti trattati in modo identico).

46. Se è dimostrato che la concentrazione oggetto di prova è stata conservata in modo soddisfacente entro un intervallo di ± 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 lo scarto rispetto alla concentrazione nominale o quella misurata inizialmente è nel limite di ± 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 (5).

Prova limite

47. 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 o in caso di una formulazione fino al limite della sua capacità di dispersione, 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

▼M7

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 che consenta di paragonare le medie, per esempio un t-test di Student.

DATI E RELAZIONI

Variabili di risposta

48. La finalità di questa prova è determinare gli effetti della sostanza chimica in esame sulla crescita vegetativa del *Myriophyllum spicatum*. Il presente metodo di prova descrive due variabili di risposta.

a) Tasso di crescita specifico medio: questa variabile di risposta è calcolata in funzione dell'evoluzione logaritmica della lunghezza del germoglio principale e in base all'evoluzione logaritmica di altri parametri di misurazione, ossia lunghezza totale dei germogli, peso fresco, peso secco o numero di verticilli nel tempo (espresso in giorni) nei gruppi di controllo e in ciascun gruppo trattato. Nota: per il parametro di misurazione dato dalla lunghezza totale dei rami laterali e della lunghezza totale delle radici non è possibile procedere a un calcolo del tasso di crescita specifico medio. All'inizio della prova l'organismo di prova non presenta né rami laterali, né radici (conformemente alla preparazione basata sulla pre-coltura). il valore di partenza è zero e il calcolo del tasso di crescita specifico medio non è definito.

b) Rendimento: questa variabile di risposta è calcolata in funzione dell'evoluzione della lunghezza del germoglio principale nonché all'evoluzione di altri parametri di misurazione — ossia preferibilmente la lunghezza totale dei germogli, il peso fresco, il peso secco o il numero di verticilli, e di altri parametri eventualmente ritenuti utili — nei gruppi di controllo e in ciascun gruppo trattato fino alla fine della prova.

49. Le stime sulla tossicità sono basate sulla lunghezza del germoglio principale e su altre tre variabili di misurazione (ossia di preferenza la lunghezza totale dei germogli, il peso fresco, il peso secco o il numero di verticilli — cfr. il paragrafo 37 e le note 2, 4 e 5 del presente paragrafo), poiché alcune sostanze chimiche potrebbero condizionare altre variabili di misurazione molto più della lunghezza media del germoglio principale. Questo effetto potrebbe passare inosservato se il calcolo si basasse unicamente sulla lunghezza dei germogli.

Tasso di crescita specifico medio

50. Il tasso di crescita specifico medio per un determinato periodo è calcolato in funzione dell'aumento logaritmico delle variabili di crescita — lunghezza del germoglio principale e tre ulteriori variabili di misurazione (ossia lunghezza totale dei germogli, peso fresco, peso secco, o numero di verticilli) — utilizzando la formula riportata qui di seguito per ciascuna replica dei gruppi di controllo e dei gruppi trattati:

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

laddove:

μ_{i-j}: tasso di crescita specifico medio dal momento i al momento j

N_i: variabile di misurazione nel recipiente di prova o di controllo al momento i

N_j: variabile di misurazione nel recipiente di prova o di controllo al momento j

t: periodo di tempo tra i e j

▼M7

Per ciascun gruppo trattato e di controllo, calcolare un tasso di crescita a medio termine e le stime della varianza.

51. Occorre calcolare il tasso di crescita specifico medio per l'intero periodo di prova (il momento «i» citato nella formula corrisponde all'inizio della prova e il momento «j» corrisponde alla fine della prova). Per ciascuna concentrazione dei gruppi trattati e di controllo, calcolare il valore medio del tasso di crescita specifico medio e le stime della varianza. Occorre inoltre valutare il tasso di crescita in ogni fase del periodo di esposizione nell'arco della prova per verificare gli effetti della sostanza chimica in esame durante il periodo di esposizione (per esempio, analizzando le curve di crescita dopo la trasformazione logaritmica).

52. 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:

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

laddove:

% I_r: percentuale di inibizione del tasso di crescita specifico medio

μ_C: valore medio di μ nel gruppo di controllo

μ_T: valore medio di μ nel gruppo trattato

Rendimento

53. Gli effetti sul rendimento sono determinati in funzione di due variabili di misurazione: la lunghezza del germoglio principale e tre ulteriori variabili di misurazione (ossia preferibilmente la lunghezza totale dei germogli, il peso fresco, il peso secco o il numero di verticilli) in ciascun recipiente di prova all'inizio e al termine della prova. Per quanto riguarda il peso fresco o il peso secco, la biomassa di partenza è determinata a partire da un campione di organismi di prova prelevato dallo stesso lotto utilizzato per inoculare i recipienti di prova. 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:

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

laddove:

% I_y: percentuale di riduzione del rendimento,

b_C: biomassa finale meno la biomassa di partenza nel gruppo di controllo

b_T: biomassa finale meno la biomassa di partenza nel gruppo trattato

Tempo di raddoppio

54. Per determinare il tempo di raddoppio (T_d) della lunghezza del germoglio principale e verificare se lo studio rispetta questo criterio di validità (cfr. il paragrafo 8), ai dati risultanti dai recipienti di controllo si applica la seguente formula:

$T_d = \ln 2/\mu$

laddove μ è il tasso di crescita specifico medio determinato secondo quanto indicato nei paragrafi 50-52.

▼M7

Tracciato delle curve concentrazione-risposta

55. Occorre tracciare curve concentrazione-risposta che raffigurano la percentuale d'inibizione media della variabile di risposta (I_r oppure I_y calcolate come indicato al paragrafo 53) e il logaritmo della concentrazione della sostanza chimica in esame.

Stima del valore EC_x

56. Le stime del valore EC_x devono basarsi sia sul tasso di crescita specifico medio (E_rC_x), sia sul rendimento (E_yC_x), e ciascuna di queste variabili in esame deve essere a sua volta basata sulla lunghezza del germoglio principale, sul peso fresco, sul peso secco o sul numero di verticilli). Questo perché esistono sostanze chimiche che hanno un impatto diverso sulla lunghezza del germoglio principale 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_rC_x (lunghezza del germoglio principale); E_rC_x (ossia preferibilmente lunghezza totale dei germogli, peso fresco, peso secco o numero di verticilli); E_yC_x (lunghezza del germoglio principale); ed E_yC_x (ossia preferibilmente lunghezza totale dei germogli, peso fresco, peso secco o numero di verticilli);

57. Occorre rilevare che i valori di EC_x calcolati utilizzando queste due variabili di risposta non sono comparabili e che occorre tenere conto di questa differenza quando si utilizzato i risultati della prova. I valori di EC_x basati sul tasso di crescita specifico medio (E_rC_x) saranno generalmente superiori a quelli basati sul rendimento (E_yC_x), se le condizioni del presente metodo di prova sono rispettate, a motivo del fondamento matematico dei rispettivi approcci. Questa differenza è dovuta solo al calcolo matematico e non va interpretata come una differenza di sensibilità tra le due variabili in esame.

Procedure statistiche

58. L'obiettivo è ottenere una relazione quantitativa concentrazione-risposta mediante un'analisi della regressione. È possibile utilizzare una regressione lineare ponderata, preceduta da una trasformazione linearizzante dei dati di risposta — per esempio con modelli probit, logit o Weibull (7), 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 (7). 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 specifiche che consentono di determinare i valori EC_x a partire da dati continui si vedano i riferimenti (8)(9) e (10).

59. Per ciascuna variabile di risposta da analizzare, occorre utilizzare il rapporto concentrazione-risposta per calcolare stime puntuali dei valori EC_x. Laddove possibile, occorre determinare gli intervalli di confidenza a 95 % per ogni stima. La corrispondenza dei dati che descrivono gli effetti rispetto al modello di regressione va valutata graficamente o statisticamente. L'analisi della regressione deve essere effettuata basandosi sulle reazioni rilevate in ogni recipiente replicato e non sulle medie dei gruppi trattati.

60. Le stime di EC_{50} e gli intervalli di confidenza possono essere ottenuti anche mediante interpolazione lineare con *bootstrapping* (10), se i modelli o i metodi di regressione disponibili non sono adatti ai dati.

61. Per stimare la LOEC, e dunque la NOEC, è necessario paragonare le medie dei gruppi trattati mediante un'analisi della varianza (ANOVA). La media di ogni concentrazione è poi confrontata con la media dei controlli mediante un metodo adeguato di comparazione multipla o un metodo di tendenza. Possono risultare utili i test di Dunnett o di William (12) (13), (14), (15), 16). È necessario controllare se l'ipotesi di omogeneità della varianza dell'ANOVA è fondata. Si raccomanda di effettuare questo controllo graficamente o con un test formale (15). A tale fine si prestano il test di Levene o quello di

▼M7

Bartlett. Se l'ipotesi dell'omogeneità della varianza non si conferma, a volte si possono 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. Ulteriori riferimenti sulla determinazione della NOEC sono reperibili al riferimento 10.

62. Alcuni progressi recenti hanno portato i ricercatori ad auspicare l'abbandono della nozione di NOEC a vantaggio di stime puntuali di EC_x basate sulla regressione. Per questa prova sul *Myriophyllum* non sono stati fissati valori adeguati di x. Tuttavia un intervallo dal 10 % al 20 % sembra appropriato (in funzione della variabile di risposta scelta) e nella relazione è preferibile riportare sia l'EC_{10} sia EC_{20}, con i rispettivi intervalli di confidenza.

Relazioni

63. La relazione sulla prova include le informazioni indicate di seguito.

Sostanza chimica in esame

Sostanza mono-costituente

— apparenza fisica, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;

— identificazione chimica, come la denominazione IUPAC o CAS, il numero CAS, il codice SMILES o InChI, la formula strutturale, l'identità chimica o le impurità, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc. (incluso il tenore di carbonio organico, se opportuno).

Sostanza multi-costituente, UVCB o miscele:

— caratterizzata nella massima misura possibile con l'identità chimica (vedasi sopra), con la presenza quantitativa e con le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti.

Specie in esame

— Nome scientifico e fonte.

Condizioni di prova

— Procedura sperimentale utilizzata (statica o semistatica).

— Data dell'inizio della prova e durata della prova.

— Mezzo di prova.

— Descrizione del disegno sperimentale: recipienti e coperchi, volumi delle soluzioni, lunghezza del germoglio principale per recipiente di prova a inizio 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 di luce, intensità luminosa e omogeneità.

— Valori del pH dei mezzi di prova e di controllo.

— Metodo di analisi della sostanza chimica in esame e dati adeguati per la valutazione della qualità (studi di convalida, scarti tipo o intervalli di confidenza delle analisi).

▼M7

— Metodi di determinazione della lunghezza del germoglio principale e delle altre variabili di misurazione, ad es. lunghezza totale dei rami laterali, lunghezza totale dei germogli, lunghezza totale delle radici, peso fresco, peso secco o numero di verticilli.

— Stato della coltura (sterile o non sterile) di ciascun recipiente di prova e di controllo a ogni osservazione.

— Tutte le differenze rispetto al presente metodo di prova.

Risultati

— Dati grezzi: lunghezza del germoglio principale 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 variabile di misurazione.

— Calcolo delle variabili studiate per ciascun replicato, con valore medio e coefficiente di variazione dei replicati.

— Rappresentazione grafica della relazione concentrazione/effetto,

— Stime degli endpoint tossici per le variabili di risposta: ad esempio EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, e relativi intervalli di confidenza. Se calcolate, la LOEC e/o la NOEC e i metodi statistici utilizzati per determinarle.

— Se è stata praticato un test ANOVA, la portata dell'effetto individuabile (ad esempio, la differenza meno significativa).

— Stimoli alla crescita eventualmente osservati in un gruppo trattato.

— Eventuali segni di fitotossicità e osservazioni delle soluzione di prova.

— Analisi dei risultati, compresa l'influenza sul risultato del test risultante dagli scostamenti dal presente metodo di prova.

BIBLIOGRAFIA

(1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.

(2) Maletzki, D. *et al*. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch,* No. 22, pp. 702–710.

(3) Capitolo C.26 del presente allegato, *Saggio di inibizione della crescita di Lemna sp.*

(4) OCSE (2014), «*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris.

(5) 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.

(6) Capitolo C.51 del presente allegato, Prova di tossicità sul *Myriophyllum spicatum* in un sistema di prova acqua-sedimento.

▼**M7**

(7) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.

(8) Nyholm, N. *et al*. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chem*istry, Vol. 11/2, pp. 157-167.

(9) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, pp. 1485-1494.

(10) OCSE (2006), «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

(11) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.

(12) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.

(14) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(15) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.

(16) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp. 93-96.

▼M7

Appendice 1

DEFINIZIONI

Biomassa: peso fresco e/o secco della materia vivente presente in una popolazione. Nella presente prova la biomassa comprende il germoglio principale, tutti i rami laterali e tutte le radici.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Clorosi: il cambiamento di colore di un organismo di prova, in particolare dei germogli, dal verde a un colore tendente al giallo.

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 *Myriophyllum spicatum* 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 (lunghezza del germoglio principale).

Crescita: aumento della variabile di misurazione, ad esempio la lunghezza del germoglio principale, la lunghezza totale dei rami laterali, la lunghezza totale dei germogli, la lunghezza totale delle radici, il peso fresco, il peso secco o il numero di verticilli, nel corso del periodo di prova.

Tasso di crescita: (tasso di crescita specifico medio): aumento logaritmico della variabile di misurazione durante il periodo di esposizione. *Nota:* La risposta relativa al tasso di crescita è indipendente dalla durata della prova a condizione che gli organismi di controllo non esposti siano soggetti a un andamento di crescita esponenziale.

Concentrazione minima a cui si osserva un effetto statisticamente significativo (LOEC — *Lowest Observed Effect Concentration*): la concentrazione più bassa saggiata 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).

Variabile di misurazione: qualsiasi tipo di variabile che viene misurata per esprimere l'endpoint della prova utilizzando una o più variabili di risposta. Nella presente prova le variabili di misurazione consistono nella lunghezza del germoglio principale, nella lunghezza totale dei rami laterali, nella lunghezza totale dei germogli, nella lunghezza totale delle radici, nel peso fresco, nel peso secco e nel numero di verticilli.

Monocultura: coltura con una sola specie vegetale.

Necrosi: tessuto morto (ossia di aspetto bianco o marrone scuro) dell'organismo di prova.

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

Variabile di risposta: la variabile per la stima della tossicità derivata da qualsiasi parametro misurato che descrive la biomassa mediante metodi diversi di calcolo. Nel presente metodo di prova, il tasso e il rendimento di crescita sono variabili di risposta derivate dalle variabili di misurazione come la lunghezza del germoglio principale, la lunghezza totale dei germogli, il peso fresco, il peso secco o il numero di verticilli.

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

▼M7

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

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

Endpoint della prova: indica il fattore generale che sarà modificato, rispetto al controllo, dalla sostanza chimica in esame. Nel presente 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.

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

UVCB: una sostanza di composizione sconosciuta o variabile, il prodotto di una reazione complessa o materiale biologico.

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. Nota: quando l'andamento della crescita è esponenziale, le variabili di risposta basate sul rendimento diminuiscono con l'aumento della durata della prova.

▼M7

Appendice 2

MEZZO DI PROVA DI ANDREWS MODIFICATO PER COLTURE MADRE E PRE-COLTURE

Il mezzo di prova di Andrews modificato necessario per le pre-colture e le colture madre è preparato partendo da cinque soluzioni madre nutritive elaborate separatamente, cui va aggiunto un 3 % di saccarosio.

Tabella 1

omposizione della soluzione nutritiva di Andrews': (Designazione ASTM: E 1913-04)

Produzione di soluzioni madre nutritive			Produzione della soluzione nutritiva
Soluzione madre	Sostanza chimica	Peso iniziale per 1 000 ml	ml per 5 l di soluzione nutritiva
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO_3	8,08 g	
	$Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$	18,88 g	
2	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	9,86 g	50
3	cfr. la soluzione madre di cui al punto 3.1		50
4	KH_2PO_4	2,72 g	50
5	$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0,278 g	50
	$Na_2EDTA \times 2\ H_2O$	0,372 g	

Le soluzioni madre possono essere conservate in frigorifero per 6 mesi (a una temperatura compresa tra i 5 e i 10 °C). Solo la soluzione madre n. 5 ha una durata di conservazione inferiore (due mesi).

Tabella 2

Produzione della soluzione madre n. 3.1 che serve per la preparazione della soluzione madre n. 3.

Sostanza chimica	Peso iniziale in g/100 ml
$MnSO_4 \times 4\ H_2O$	0,223
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	0,115
H_3BO_3	0,155
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,0125
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4\ H_2O$	0,0037

Una volta ottenuta la soluzione madre n. 3.1 (tabella 2), è necessario congelarla (a una temperatura di almeno – 18 °C) in aliquote di circa 11 ml. Queste porzioni congelate hanno una durata di conservazione di cinque anni.

Per la preparazione della soluzione madre 3, scongelare la soluzione 3.1, versarne 10 ml in un matraccio tarato da 1 litro e aggiungere dell'acqua distillata ultrapura fino all'apposito segno sul matraccio.

Per ottenere un mezzo di prova di Andrews modificato, versare circa 2 500 ml di acqua distillata ultrapura in un matraccio tarato a 5 l. Aggiungere 50 ml di ciascuna soluzione madre, riempire il 90 % del matraccio con acqua distillata ultrapura e portare a un pH di 5,8.

▼M7

In seguito, aggiungere 150 g di saccarosio disciolto (3 % per 5 l); successivamente riempire il matraccio con acqua distillata ultrapura fino all'apposito segno. Infine, versare la soluzione nutritiva in matracci Schott da 1 l e sottoporre a trattamento in autoclave a 121 °C per 20 minuti.

La soluzione nutritiva così ottenuta può essere mantenuta in stato sterile in un refrigeratore (a 5-10 °C) per tre mesi.

Mezzo di prova di Andrews per prove di tossicità senza sedimento

Per ottenere le soluzioni di prova, si parte dalle cinque soluzioni madre nutritive già menzionate nelle tabelle 1 e 2 e si prepara un mezzo di prova di Andrews non modificato con concentrazione decuplicata, con un'aggiunta di saccarosio pari al 30 %. Per fare ciò è necessario versare circa 100 ml di acqua distillata ultrapura in un matraccio tarato a 1 l. Aggiungere 100 ml di ciascuna delle succitate soluzioni madre, raggiungere un pH di 5,8. In seguito, aggiungere il 30 % di saccarosio disciolto (300 g per 1 000 ml); successivamente riempire il matraccio con acqua distillata ultrapura fino all'apposito segno.

Infine, versare la soluzione nutritiva in matracci Schott da 0,5 l e porre in autoclave a 121 °C per 20 minuti.

La soluzione nutritiva modificata e concentrata così ottenuta può essere mantenuta in stato sterile in un refrigeratore (a 5-10 °C) per tre mesi.

▼M7

Appendice 3

MANTENIMENTO DI UNA COLTURA MADRE

Nella presente appendice 3 si descrive la coltura madre *Myriophyllum spicatum* L [1], una specie di piante acquatiche sommerse della classe delle dicotiledoni, del genere delle millefoglie d'acqua. Tra giugno e agosto produce dei fiori non molto appariscenti di color rosa-bianco che emergono dallo specchio d'acqua. Le radici delle piante sono ancorate al suolo con un sistema di rizomi robusti. Queste piante crescono nell'intero emisfero boreale in acque stagnanti eutrofiche ma non inquinate e con un tenore di calcio piuttosto elevato, con un substrato fangoso. Il *Myriophyllum spicatum* predilige l'acqua dolce, ma cresce anche in acque salmastre.

Per creare una coltura madre in un sistema senza sedimento a condizioni di laboratorio è necessario ricorrere a piante sterili. Tali piante possono essere reperite dal laboratorio ecotossicologico dell'Ufficio federale tedesco per l'ambiente (*Deutsches Umweltbundesamt*).

In alternativa gli organismi di prova possono essere preparati usando piante non sterili conformemente alla designazione ASTM E 1913-04. Il seguente estratto dalla guida generale ASTM descrive la procedura necessaria per ottenere una coltura di *Myriophyllum sibiricum* reperiti in natura:

> «Se si opta per la raccolta di piante non sterili in natura, si raccomanda di raccogliere i turioni in autunno. Inserire i turioni in un acquario da 20 l che contiene 5 cm di sedimento sterile coperto da sabbia di silicea ad esempio da Turface® e 18 l di acqua di reazione. Aerare l'acquario e mantenerlo a una temperatura di 15 °C con un flusso tra i 200 e i 300 μmol m^{-2} s^{-1} per 16 ore al giorno. La coltura di piante nell'acquario può essere mantenuta come fonte di riserva di piante nel caso in cui le colture di piante sterili fossero distrutte da malfunzionamenti meccanici nella camera di crescita o per altre ragioni. Le piante cresciute nell'acquario non sono sterili e le colture sterili non possono essere conservate in un sistema di coltura in batch. Al fine di sterilizzare la coltura, le piante sono rimosse dall'acquario e sciacquate con acqua corrente deionizzata per circa 0,5 h. In condizioni asettiche in una camera con flusso d'aria laminare, le piante sono disinfettate per meno di 20 minuti (fino a quando i tessuti della maggior parte delle piante non sono sbiancati e rimane verde solo l'apice in crescita) in una soluzione di ipoclorito di sodio al 3 % (peso/volume) contenente lo 0,01 % di un tensioattivo idoneo. Agitare il disinfettante e il materiale vegetale. I segmenti che presentano diversi nodi sono trasferiti in tubi di coltura sterili che contengono 45 ml di mezzo di prova di Andrews sterile modificato e sono chiusi con tappi standard. In ogni camera di prova va inserito un solo segmento vegetale. Per far sì che i recipienti di prova siano ben chiusi, la sigillazione avviene con pellicola da laboratorio. Una volta stabilita la coltura stabile, i segmenti vegetali che presentano diversi nodi vanno trasferiti nelle nuove camere di prova che contengono mezzo nutritivo liquido fresco preparato ogni dieci-dodici giorni. Come dimostrato con la creazione di colture su piastra di agar, le piante devono essere sterili e rimanere tali per otto settimane prima che si possa iniziare la prova.»

Poiché il mezzo di prova di Andrews modificato contiene saccarosio (che stimola la crescita di funghi e batteri), tutti i materiali, le soluzioni e la creazione di colture vanno tenuti in condizioni sterili. Tutti i liquidi e tutta l'attrezzatura sono sterilizzati prima dell'uso. La sterilizzazione avviene tramite un trattamento termico ad aria calda (210 °C) dalla durata di 4 ore o tramite un trattamento in autoclave di 20 minuti a 121 °C. Inoltre, tutti i matracci, le piastre, le ciotole, ecc. e le altre attrezzature sono sottoposti a trattamento a fiamma su un piano di lavoro sterilizzato immediatamente prima dell'uso.

Le colture madre possono essere conservate a bassa illuminazione e temperatura (50 μE m^{-2} s^{-1}, 20 ± 2 °C) per lunghi periodi senza che occorra ristabilirle. Il mezzo di crescita del *Myriophyllum* può essere identico a quello utilizzato per le

[1] Carl von Linné (* 23 maggio, 1707 a Råshult/Älmhult; † 10 gennaio 1778 a Uppsala).

▼M7

prove, ma è possibile utilizzare anche altri mezzi ricchi di nutrienti per le colture madre.

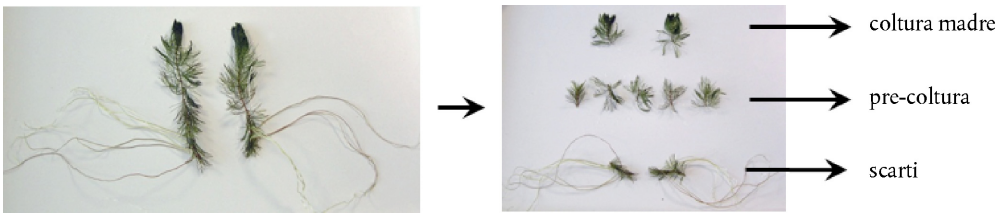
I segmenti vegetali sono distribuiti in maniera axenica in diversi matracci Erlenmeyer da 500 ml e/o matracci Fernbach da 2 000 ml, con un contenuto per ciascun matraccio di rispettivamente 450 ml o 1 000 ml di mezzo di prova di Andrews modificato. In seguito i matracci sono chiusi in maniera axenica con tappi di cellulosa.

Oltre a ciò è assolutamente necessario sottoporre a trattamento a fiamma su un piano di lavoro sterilizzato immediatamente prima dell'uso. In funzione del numero e delle dimensioni, le piante vanno trasferite in una soluzione nutritiva fresca circa ogni tre settimane.

Per questa coltura rinnovata è possibile usare apici e segmenti della parte centrale del fusto. Il numero e la dimensione delle piante (o dei segmenti vegetali) dipendono dalla quantità di piante necessaria. Ad esempio, è possibile trasferire cinque segmenti di germoglio nel matraccio Fernbach e tre segmenti di germoglio in un matraccio Erlenmeyer, ciascuno con una lunghezza di 5 cm. Scartare tutte le parti che presentano radici, fioriture, componenti morte o altri elementi evidenti.

Figura 1

sezionamento delle piante per la coltura madre e la pre-coltura dopo 3 settimane di coltivazione.



La coltivazione delle piante avviene in matracci Erlenmeyer da 500 ml e in flaconi Fernbach da 2 000 ml in un incubatore di raffreddamento a 20 (± 2) °C con illuminazione costante a 100-150 µE m^{-2} s^{-1} o 6 000-9 000 Lux (emessa dalla camera di illuminazione con una temperatura di colore corrispondente a una «luce bianca calda»).

Figura 2

Coltivazione di piante in un incubatore di raffreddamento in camera illuminata.



Occorre utilizzare recipienti di coltura in vetro sterili e chimicamente puliti (lavati con acido) e manipolare il materiale secondo tecniche asettiche. In caso di contaminazione della coltura madre, ad es. da alghe, funghi e/o batteri, per rinnovarla va preparata una nuova coltura o coltura madre proveniente da un altro laboratorio.

▼M7

Appendice 4

MANTENIMENTO DI UNA PRE-COLTURA E PREPARAZIONE DI UN ORGANISMO DI PROVA

Per ottenere una pre-coltura, tagliare i germogli della coltura madre in segmenti, ciascuno con due verticilli. Inserire questi segmenti nei matracci Fernbach riempiti con mezzo di prova di Andrews modificato (con 3 % di saccarosio). Ciascun matraccio può contenere fino a 50 segmenti di germoglio. Tuttavia è necessario far sì che i segmenti siano vitali e non presentino nessuna radice, né rami laterali, né le loro gemme (cfr. la figura 1 dell'appendice 3).

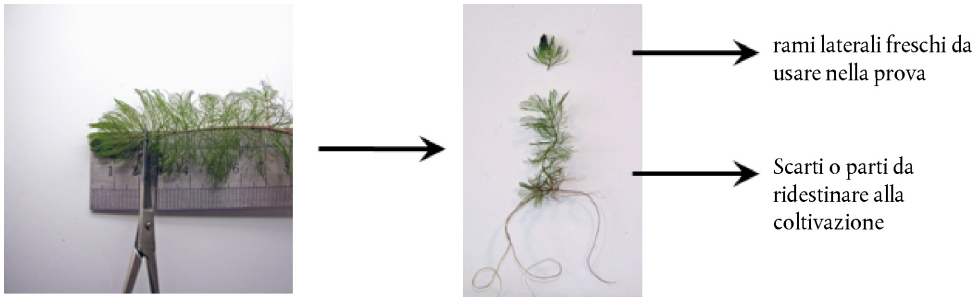
La pre-coltura dura da 14 a 21 giorni in condizioni sterili in una camera ambientale con fasi alternate buio/luce di 16:8 ore. L'intensità luminosa sarà compresa tra 100 e 150 µE m^{-2} s^{-1}. La temperatura nei recipienti di prova deve essere mantenuta a 23 (± 2) °C.

Poiché il mezzo di prova di Andrews modificato contiene saccarosio (che stimola la crescita di alghe, funghi e batteri), sia la preparazione delle soluzioni della sostanza chimica in esame, sia la creazione di colture vanno condotte in condizioni sterili. Tutti i liquidi e tutta l'attrezzatura sono sterilizzati prima dell'uso. La sterilizzazione avviene tramite un trattamento termico ad aria calda (210 °C) dalla durata di 4 ore o tramite trattamento in autoclave di 20 minuti a 121 °C. Inoltre, tutti i matracci, le piastre, le ciotole, ecc. e le altre attrezzature sono sottoposti a trattamento a fiamma su un piano di lavoro sterilizzato immediatamente prima dell'uso.

I germogli sono rimossi in maniera axenica dai matracci che contengono le pre-colture, avendo cura di scegliere, nei limiti del possibile, materiale omogeneo. Ciascuna sperimentazione richiede almeno 60 organismi sperimentali (con otto concentrazioni chimiche di prova). Per la prova è necessario servirsi di rami laterali freschi di pre-colture, accorciare a 2,5 dalla base (misurazione con righello) e trasferirli in un becher che contiene mezzo di prova di Andrews modificato. I rami laterali freschi possono essere usati per il test di tossicità di *Myriophyllum spicatum* in un sistema senza sedimento.

Figura 2

Taglio delle piante della pre-coltura per il test di tossicità su *Myriophyllum spicatum* in un sistema senza sedimento



▼M7

C.51. PROVA DI TOSSICITÀ SU *MYRIOPHYLLUM SPICATUM* IN UN SISTEMA DI PROVA ACQUA-SEDIMENTO

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 239 (2014). Sono disponibili metodi di prova per specie di *Lemna*, piante acquatiche flottanti della classe delle monocotiledoni (1), e per specie di alghe (2). Questi metodi sono usati di routine per generare dati per individuare i rischi che comportano le sostanze chimiche in esame, in particolare le sostanze chimiche con attività erbicide, per le specie vegetali acquatiche non bersaglio. Tuttavia in alcuni casi possono risultare necessari ulteriori dati per altri macrofiti. Secondo un documento di orientamento pubblicato di recente nel quadro di un workshop dalla SETAC (*Society of Environmental Toxicology and Chemistry*) sulla valutazione del rischio per i macrofiti acquatici legato ai pesticidi (AMRAP), in certi casi può essere necessario disporre di dati sugli effetti su specie di macrofiti con radici di sostanze chimiche in esame alle quali è noto che la specie *Lemna* e le alghe non sono sensibili o il cui coefficiente di ripartizione con il sedimento indica una possibile esposizione attraverso le radici (3). Sulla base delle conoscenze ed esperienze attuali, le specie di *Myriophyllum spicatum* sono state selezionate come specie di elezione in casi in cui i dati da reperire riguardano specie di dicotiledoni sommerse e con radici (4) (5) (6). La presente prova non sostituisce altre prove di tossicità acquatica, ma è volta piuttosto a integrarle per consentire una maggiore completezza della valutazione del pericolo e dei rischi per la flora acquatica. Il metodo di prova su *Myriophyllum spicatum* in un sistema di prova acqua-sedimento integra il test di tossicità su *Myriophyllum spicatum* in un sistema di prova senza sedimento (7).

2. Il presente documento descrive il metodo di prova che consente di valutare gli effetti di una sostanza chimica in esame sulla specie di pianta acquatica con radici *Myriophyllum spicatum* in un sistema acqua-sedimento. Il metodo di prova si basa parzialmente su metodi esistenti (1), (2) (8) e tiene conto delle recenti ricerche legate alla valutazione del rischio legato a piante acquatiche (3). Il metodo acqua-sedimento è stato validato da una prova interlaboratorio internazionale condotta con *Myriophyllum spicatum* coltivati in situazioni statiche ed esposti alla sostanza chimica in esame per mezzo di applicazioni tramite colonna d'acqua (9). Tuttavia, il sistema di prova è facilmente adattabile a un'esposizione tramite sedimento addizionato o un'esposizione tramite la fase acquatica in scenari semistatici o a dose pulsata, sebbene tali scenari non siano stati formalmente oggetto di prove interlaboratorio. Inoltre, il metodo generale può essere usato per altre specie con radici, sommerse o emergenti, incluse altre specie di *Myriophyllum spicatum* (ad es. *Myriophyllum acquaticum) e Glyceria maxima* (10). In caso di prove su altre specie può essere necessario adeguare le condizioni di prova, il disegno sperimentale e la durata. In particolare, sono necessari maggiori interventi per definire procedure appropriate per *Myriophyllum acquaticum*. Queste opzioni non sono presentate in dettaglio nel presente metodo di prova, che descrive l'approccio standard per l'esposizione di *Myriophyllum spicatum* in un sistema statico tramite la fase acquatica.

3. Il presente metodo di prova si applica alle sostanze per le quali il metodo è stato validato (per maggiori dettagli si rimanda alla relazione sulla prova interlaboratorio (9), alle formulazioni o a miscele conosciute. Una prova su *Myriophyllum* può essere condotta per soddisfare la necessità di disporre di dati più generici (di primo livello — *Tier 1*) originata da una possibile ripartizione della sostanza chimica in esame nel sedimento o per questioni relative alla modalità di azione/selettività. Analogamente, una prova di laboratorio su *Myriophyllum* può essere richiesta nel quadro di una strategia più specifica (*higher tier*) volta a rispondere alle preoccupazioni in merito al rischio per le piante acquatiche. La motivazione specifica per la conduzione di una prova determinerà la via di esposizione (ossia acqua o sedimento). Prima dell'uso del metodo di prova su una miscela, per la generazione di dati per un determinato scopo normativo, occorre esaminare se, e in caso affermativo perché, può fornire risultati adeguati a tale scopo. Tali considerazioni non sono necessarie in presenza di un obbligo normativo di prova sulla miscela.

▼M7

PRINCIPIO DELLA PROVA

4. La prova è impostata in modo da valutare gli effetti legati a sostanze chimiche sullo sviluppo vegetativo di piante di *Myriophyllum* coltivate in mezzi standardizzati (acqua, sedimento e nutrienti). A tal fine, gli apici dei germogli di piante sane e non in fiore sono inseriti in sedimento standardizzato e artificiale, arricchito con altri nutrienti per garantire un'adeguata crescita della pianta e in seguito mantenuto in un mezzo di prova di Smart e Barko (appendice 1). Trascorso un periodo di impianto che consente la formazione di radici, le piante sono esposte a una serie di concentrazioni di prova aggiunte alla colonna d'acqua. In alternativa, l'esposizione tramite il sedimento può essere simulata aggiungendo la sostanza chimica in esame al sedimento artificiale e trasferendo le piante in tale sedimento addizionato. In entrambi i casi le piante sono successivamente tenute in condizioni ambientali controllate per 14 giorni. Gli effetti sulla crescita sono determinati dalla valutazione quantitativa della lunghezza del germoglio, del peso fresco e del peso secco, nonché da osservazioni qualitative di sintomi come clorosi, necrosi o deformazioni nella crescita.

5. Per quantificare gli effetti della sostanza chimica, si confronta la crescita nelle soluzioni di prova con quella delle piante di controllo e la concentrazione che causa una data percentuale di inibizione della crescita (per esempio 50 %), dove EC_x (ad esempio EC_{50}) «x» può corrispondere a qualsiasi valore prescritto dal quadro regolamentare, ad es. EC_{10}, EC_{20} ed EC_{50}. Va notato che le stime dei valori di EC_{10} ed EC_{20} sono affidabili e idonee solo nelle prove in cui i coefficienti di variazione per le piante di controllo sono inferiori al livello di effetto stimato, pertanto per un valore EC_{20} i coefficienti di variazione dovrebbero rimanere al di sotto del 20 %.

6. È opportuno determinare il tasso specifico di crescita medio (stimato in base alla lunghezza dei germogli, al peso fresco dei germogli e al peso secco degli stessi) e del rendimento (stimato in base alla crescita della lunghezza del germoglio principale, al peso fresco del germoglio e al suo peso secco) delle piante trattate e non trattate. Di conseguenza il tasso di crescita specifico (r — *rate*) e il rendimento (y — *yield*) sono usati per determinare, rispettivamente, il valore E_rC_x (ad es. E_rC_{10}, E_rC_{20}, E_rC_{50}) e il valore E_yC_x (ad es. E_yC_{10}, E_yC_{20}, E_yC_{50}).

7. Se necessario, la concentrazione minima a cui si osserva un effetto statisticamente significativo (LOEC) e la concentrazione senza effetti osservabili (NOEC) possono essere determinate mediante un calcolo statistico facendo rifermento a stime sui tassi di crescita specifici medi e sul rendimento.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA CHIMICA IN ESAME

8. Occorre disporre di un metodo analitico con un'adeguata sensibilità per la quantificazione delle sostanze chimiche nel mezzo di prova.

9. Le informazioni sulla sostanza chimica in esame che possono essere utili per stabilire le condizioni sperimentali comprendono la formula strutturale, la composizione in caso di sostanze multi-costitutive, le UVCB, le miscele o le formulazioni, la purezza, l'idrosolubilità, la stabilità in acqua e alla luce, la costante di dissociazione acida (pK_a), il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (K_{ow}), se possibile il K_d nei sedimenti, la pressione di vapore e la biodegradabilità. L'idrosolubilità e la pressione di vapore possono essere utilizzate per calcolare la costante di Henry, che indica se possono verificarsi perdite significative della sostanza chimica in esame nel corso della prova. Se è probabile che ci siano delle perdite di sostanze chimiche in esame, tali perdite vanno quantificate e vanno documentati i successivi accorgimenti per controllare tali perdite. Quando le informazioni sulla solubilità e la stabilità della sostanza chimica in esame non sono conosciute con certezza, si consiglia di verificarle nelle condizioni sperimentali, ossia nel mezzo di crescita, alla temperatura e con l'illuminazione che si utilizzeranno nella prova. *Nota:* quando la prova riguarda erbicidi con un'azione perossidante foto-indotta, l'illuminazione usata in laboratorio sarà regolata in modo tale da emettere raggi ultravioletti equivalenti a quelli della luce naturale del sole.

▼M7

10. Il pH è misurato e regolato adeguatamente nel mezzo di prova. È particolarmente importante regolare il pH del mezzo di prova, ad es. quando si saggiano metalli o sostanze chimiche idroliticamente instabili. Un documento di orientamento OCSE (11) fornisce ulteriori orientamenti per saggiare sostanze chimiche le cui proprietà fisico-chimiche rendono difficile la conduzione delle prove.

VALIDITÀ DELLA PROVA

11. Affinché la prova risulti valida, la lunghezza media totale dei germogli e il peso fresco medio totale nelle piante di controllo devono almeno raddoppiare nel corso della fase di esposizione della prova. Inoltre, le piante di controllo non devono presentare nessun sintomo visibile di clorosi e non devono essere osservabili contaminazioni da parte di altri organismo, come pellicole di alghe e/o batteri sulle piante, sulla superficie del sedimento e nel mezzo di prova.

12. Nelle colture di controllo, il coefficiente di variazione medio del rendimento basato sulle misurazioni del preso fresco del germoglio (ossia tra l'inizio e la fine della prova) non deve superare il 35 % tra le varie repliche.

SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

13. Una o più sostanze chimiche di riferimento, come per esempio il 3,5-diclorofenolo utilizzato nella prova interlaboratorio (9), vanno esaminate periodicamente al fine verificare i risultati della procedura di prova nel tempo. Sulla base dei risultati della prova interlaboratorio, i valori medi di EC_{50} del 3,5-diclorofenolo per le diverse variabili di risposta sono compresi tra 4,7 mg/l e 6,1 mg/l (per i dettagli sull'intervallo di confidenza anticipato associato a tali valori si rimanda alla relazione sulla prova interlaboratorio). 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 irregolare, parallelamente alle prove di tossicità definitive. La relazione statistica della prova interlaboratorio internazionale (9) fornisce orientamenti relativi ai valori EC_{50} per il 3,5-diclorofenolo.

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiatura di prova

14. La prova dovrebbe essere svolta in condizioni ambientali controllate, ossia in una camera di crescita, in una stanza o in un laboratorio, con la possibilità di determinare la durata del giorno, dell'illuminazione e della temperatura (cfr. la sezione «condizioni di prova», paragrafi 56-58). Le colture madre vanno mantenute separate dai recipienti di prova.

15. Per lo studio si usano recipienti in vetro come acquari e becher. sono comunemente impiegati becher in vetro da 2 litri (circa 24 cm di altezza e 11 cm di diametro). Possono tuttavia essere impiegati altri recipienti (ad esempio più larghi), a condizione che ci sia una quantità sufficiente di acqua che consenta una crescita illimitata e una completa sommersione delle piante per l'intera durata della prova.

16. Per inserire le piante nel sedimento si può ricorrere a vasi di piante in plastica o in vetro (approssimativamente con un diametro di 9 cm, un'altezza di 8 cm e un volume di 500 ml). In alternativa si possono usare anche becher in vetro, una scelta preferibile in alcuni casi (ad esempio nei test su sostanze chimiche idrofobiche o con un elevato valore K_{ow}).

17. La scelta della dimensione del vaso/becher va considerata insieme alla scelta dei recipienti di prova e del disegno sperimentale (vedasi infra). Se si utilizza un disegno sperimentale di tipo A (un germoglio per vaso con tre vasi per recipiente), possono essere necessari vasi più piccoli o recipienti più grandi. Se si utilizza un disegno sperimentale di tipo B (tre germogli per vaso con un vaso per recipiente), le dimensioni dei vasi indicate dovrebbero essere adeguate. In ogni caso, la profondità minima dell'acqua in cui sono sommerse le piante dovrebbe essere di 12 cm superiore all'altezza del sedimento e va registrato il rapporto superficie/volume del sedimento e superficie/volume dell'acqua.

▼M7

Organismo sperimentale

18. Gli approcci generali descritti nel presente metodo di prova possono essere utilizzati per testare una serie di specie vegetali acquatiche. Tuttavia, le condizioni descritte nel presente metodo di prova sono adeguate nello specifico alla *Myriophyllum spicatum*, della famiglia delle millefoglie d'acqua. Questa specie appartiene alla classe di dicotiledoni che fa parte della famiglia delle Aloragidacee.

19. Il *Myriophyllum spicatum* (millefoglio d'acqua comune) è una specie con radici sommerse, che sopravvive in una vasta gamma di condizioni e si trova in corpi d'acqua statici o correnti. Il *M. spicatum* è una pianta le cui radici sono l'unica parte che sopravvive in inverno. In generale queste piante fioriscono e producono semi liberamente, sebbene la propagazione vegetativa da gemme ascellari o frammenti del fusto che si staccano naturalmente o in seguito all'intervento di agenti esterni, sia spesso il principale metodo di colonizzazione.

Coltivazione dell'organismo di prova:

20. I vegetali possono essere ottenuti da popolazioni naturali o tramite fornitori di piante acquatiche. In entrambi i casi, va documentata la provenienza delle piante e verificata l'identità della specie. In occasione dei prelievi in natura, è necessario procedere con la massima cura per scegliere la specie desiderata, in particolare nelle regioni in cui sussiste il rischio di formazione di ibridi con altre specie di *Myriophyllum.* In caso di dubbio, si raccomanda di ricorrere a colture da laboratorio da fonti note. Le piante che sono state esposte a eventuali contaminanti chimici o raccolte da siti che risultano contaminati sono da escludere dal presente metodo di prova.

21. Nelle regioni in cui non è facile disporre di *M. spicatum* nei mesi invernali, può essere necessario ricorrere a un mantenimento a lungo termine di colture madre in serra o in condizioni di laboratorio. Le colture madre vanno mantenute a condizioni analoghe a quelle di prova, sebbene l'irradiazione e la temperatura possano essere ridotte al fine di diminuire la frequenza degli interventi di mantenimento della coltura (ad esempio, quando non sono previste prove su *Myriophyllum* per un dato periodo). Si raccomanda l'uso di acquari e vasi per piante più grandi di quelli impiegati nelle prove, al fine di fornire spazio per la proliferazione. La composizione del sedimento e del mezzo acquoso è identica a quella usata nella prova, sebbene possano essere utilizzati metodi alternativi di fertilizzazione del sedimento (formulazioni con fertilizzante commerciale a rilascio lento).

22. Le colture madre devono essere chiaramente esenti da contaminazioni di altri organismi, compresi lumache, alghe filamentose, funghi e insetti, ad esempio uova o larve della falena *Paraponyx stratiotata* e larve o esemplari adulti di *Eubrychius velutus*. Può essere necessario risciacquare il materiale vegetale con acqua dolce per rimuovere ogni contaminazione visibile. Dovrebbero inoltre essere compiuti sforzi per ridurre al minimo lo sviluppo di alghe unicellulari e la contaminazione batterica, sebbene non sia necessario che il materiale vegetale sia completamente sterile. Le colture madre vanno monitorate e travasate a seconda delle necessità per evitare lo sviluppo di contaminazioni da alghe e batteri. Nel caso in cui una contaminazione dovesse diventare problematica può essere utile aerare le colture madre.

23. In ogni caso le piante sono coltivate/acclimatate a condizioni simili, ma non identiche, a quelle usate nella prova, per un periodo adeguato (vale a dire > 2 settimane) prima del loro utilizzo in una prova.

24. Le colture madre che presentano infiorescenze vanno escluse dalle prove poiché la crescita vegetativa di norma cala nel corso e in seguito alla fioritura.

▼M7

Sedimento

25. Per questo test si raccomanda di utilizzare il sedimento artificiale usato nel capitolo C.28 del presente allegato (8). Il sedimento è preparato come indicato nel metodo di prova C.28, eccezion fatta per l'aggiunta di sostanze nutritive come descritto di seguito:

a) 4-5 % di torba (peso secco, 2 ± 0,5 % di carbonio organico), 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 preferibile ≤ 1 mm) ed essiccata unicamente all'aria;

b) 20 % (peso secco) di argilla caolinica (tenore di caolinite di preferenza superiore al 30 %);

c) 75-76 % (peso secco) di sabbia di quarzo (composta in prevalenza da sabbia fine, con oltre il 50 % delle particelle di granulometria compresa tra 50 e 200 μm);

d) è aggiunto un mezzo nutritivo acquoso per far sì che il sedimento finale contenga 200 mg/kg di sedimento secco sia di cloruro di ammonio, sia di fosfato di sodio e che il tenore di umidità della miscela finale si attesti tra il 30 % e il 50 %;

e) è aggiunto carbonato di calcio di qualità chimicamente pura ($CaCO_3$) per aggiustare il pH della miscela finale a 7,0 ± 0,5.

26. Il luogo di provenienza di torba, argilla caolinica e sabbia deve essere noto e documentato. Se l'origine è ignota o ci sono margini di incertezza, occorre verificare che i componenti del sedimento non siano contaminati da sostanze chimiche (ad esempio metalli pesanti, composti organoclorurati, composti organofosforici).

27. I componenti secchi del sedimento devono essere miscelati in maniera uniforme prima che la soluzione nutritiva acquosa sia miscelata in maniera omogenea nel sedimento. Il sedimento umido deve essere preparato almeno due giorni prima dell'uso, onde consentire che la torba sia completamente imbevuta ed evitare che le particelle idrofobe di torba flottino in superficie quando il sedimento viene coperto dal mezzo di prova; prima dell'uso il sedimento umido può essere conservato al buio.

28. Per la prova, il sedimento viene trasferito in contenitori di dimensioni adeguate, come vasi con un diametro che consenta di inserirli nei recipienti in vetro (la superficie del sedimento deve coprire circa il 70 % o più della superficie del recipiente). Nei casi in cui il contenitore presenti dei fori nella parte inferiore, un pezzo di carta da filtro nella parte inferiore del contenitore contribuirà a mantenere il sedimento all'interno dello stesso. I vasi sono riempiti con il sedimento in modo tale che la superficie del sedimento sia livellata, prima di procedere alla copertura con uno strato sottile (~ 2 a 3 mm) di materiale inerte come sabbia, ghiaia fine da giardino (o corallo frantumato) per mantenere un corretto posizionamento.

Mezzo di prova

29. Per la coltivazione e i test su *Myriophyllum spicatum* si raccomanda di usare il mezzo di prova di Smart e Barko (12). La preparazione di questo mezzo è riportata nell'appendice 1. Ai fini di una crescita ottimale delle piante, il pH del mezzo (fase acquatica) all'inizio della prova è compreso tra 7,5 e 8,0.

Disegno sperimentale

30. La prova deve comprendere un minimo di sei recipienti di prova per le repliche per il controllo non trattato e un minimo di quattro recipienti di prova per ciascuno degli almeno cinque livelli di concentrazione.

31. 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.

▼M7

32. Ciascun recipiente di prova corrisponde a una replica che contiene tre germogli. Vi sono due opzioni per la coltivazione di tre germogli in ciascun recipiente di prova:

— Disegno sperimentale di tipo A: un germoglio per vaso e tre vasi per recipiente.

— Disegno sperimentale ti tipo B: tre germogli per vaso e un vaso per recipiente.

— Si possono accettare disegni sperimentali alternativi di un germoglio per vaso e per recipiente, a condizione che la replica sia adeguata, come richiesto, al conseguimento dei necessari criteri di validità.

33. I singoli recipienti di prova vanno assegnati a random ai gruppi di trattamento. La disposizione casuale dei recipienti di prova nell'area di prova è necessaria per ridurre al minimo l'impatto delle differenze spaziali di intensità di luce o di temperatura.

Concentrazioni della sostanza chimica in esame e gruppi di controllo

34. Di norma le concentrazioni devono seguire una serie geometrica; il fattore di separazione tra le concentrazioni non deve essere superiore a 3,2, Per determinare le concentrazioni sperimentali adeguate è utile conoscere già la tossicità della sostanza chimica in esame sulla base di precedenti prove a diversi intervalli di concentrazione.

35. Per determinare il valore EC_x, le concentrazioni di prova devono essere intorno al valore EC_x per garantire un intervallo di confidenza adeguato. Ad esempio, quando si valuta il valore EC_{50}, la concentrazione di prova più elevata deve essere superiore al valore EC_{50}. Se il valore EC_{50} si situa al di 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. L'utilizzo di un maggior numero di concentrazioni di prova migliorerà l'intervallo di confidenza attorno al valore EC_x.

36. Al fine di determinare la LOEC/NOEC (endpoint facoltativo), la concentrazione di prova più bassa deve essere sufficientemente contenuta da far sì che la crescita non sia notevolmente diversa da quella nelle piante di controllo. La concentrazione di prova più elevata deve invece essere sufficientemente alta da far sì che la stessa sia significativamente inferiore a quella del controllo. L'utilizzo di un maggior numero di repliche migliorerà la potenza statistica dell'approccio che si basa sulla concentrazione senza effetti e l'analisi della varianza.

Prova limite

37. 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 o in caso di formulazione fino al limite della sua capacità di dispersione, 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 oppure a 1 000 mg/kg di sedimento secco). Questa prova deve rispettare i principi generali di un test dose/risposta standard, ad eccezione del fatto che si raccomanda di aumentare il numero minimo di repliche a sei recipienti di prova per controllo e per concentrazione. La crescita nel gruppo di controllo e nel gruppo trattato può essere analizzata mediante una prova statistica che consenta di paragonare le medie, per esempio un t-test di Student.

Soluzioni di prova

38. Le soluzioni di prova sono generalmente create mediante diluizione di una soluzione madre, preparata sciogliendo o disperdendo la sostanza in esame in un mezzo di prova di Smart e Barko, usando acqua demineralizzata (distillata o deionizzata — cfr. appendice 1).

▼M7

39. La concentrazione di prova massima non può di norma superare l'idrosolubilità della sostanza chimica in esame o, nel caso di formulazioni, la capacità di dispersione alle condizioni di prova.

40. 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 tali solventi o disperdenti. I solventi o i disperdenti non devono indurre 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). In tali circostanze, tutti i trattamenti e i controlli (solvente) devono contenere la stessa concentrazione di solvente o disperdente. Anche le repliche di controllo non trattate che non contengono un solvente o un disperdente sono incorporate nel disegno sperimentale. Ulteriori informazioni sull'uso dei disperdenti sono riportate nel relativo documento di orientamento OCSE (11).

PROCEDURA DI PROVA

41. La procedura di prova varia a seconda della via di applicazione della sostanza chimica in esame (fase acquatica o del sedimento). Il probabile comportamento della sostanza chimica in esame in un sistema acqua-sedimento deve essere preso in considerazione nella scelta del regime di esposizione usato nella prova (ossia statico o a ricambio statico, con acqua addizionata o sedimento addizionato). In alcuni casi può essere preferibile usare il sedimento addizionato per le prove relative a sostanze chimiche che si ripartiscono significativamente nel sedimento.

Fase di impianto

42. Sezionare apici/estremità di germogli sani, ossia senza germogli laterali, sono sezionati dalle piante della coltura per ottenere una lunghezza dei germogli di 6 cm (± 1 cm). Se si utilizza un disegno sperimentale di tipo A (un germoglio per vaso con tre vasi per recipiente), si impianta un'estremità di germoglio in ciascun vaso. Se si utilizza un disegno sperimentale di tipo B (tre germogli per vaso con un vaso per recipiente), si impiantano da quattro a cinque apici di germoglio in ciascun vaso contenente il sedimento.

43. In entrambi i casi i vasi in eccesso vanno comunque utilizzati al fine di consentire di selezionare piante uniformi a inizio prova e per garantire la presenza di piante di riserva da utilizzare per il controllo della crescita delle radici immediatamente prima del trattamento e piante di riserva da raccogliere per misurare la biomassa e la lunghezza del germoglio al giorno 0.

44. I germogli sono inseriti in modo da tenere circa tre cm, comprendenti almeno due nodi, al di sotto della superficie del sedimento.

45. I vasi sono in seguito trasferiti nei recipienti di prova alle stesse condizioni ambientali della fase di esposizione e mantenuti in un mezzo di prova di Smart e Barko per sette giorni al fine di indurre lo sviluppo delle radici.

46. Trascorso questo tempo, diverse piante nei vasi di riserva vanno rimosse ai fini del controllo della crescita delle radici. Se non è osservabile alcuna crescita delle radici (ossia non sono visibili le estremità delle radici), la fase di impianto va estesa fino a quando tale crescita non sarà riconoscibile. Si raccomanda di effettuare questo passaggio per garantire che le piante crescano attivamente al momento dell'inizio della prova.

▼M7

Selezione di materiale vegetale uniforme

47. Se si utilizza un disegno sperimentale di tipo A (un germoglio per vaso con tre vasi per recipiente), prima dell'inizio della prova i vasi sono selezionati in funzione della loro uniformità. Se si utilizza un disegno sperimentale di tipo B (tre germogli per vaso con un vaso per recipiente), le piante in eccesso sono rimosse al fine di tenere tre piante uniformi in termini di dimensioni e aspetto.

Esposizione tramite la fase acquatica

48. Le estremità, selezionate con criterio di uniformità, sono inserite nei recipienti di prova come richiesto dal disegno sperimentale. In seguito si aggiunge ai recipienti il mezzo di prova di Smart e Barko. Si avrà cura di arrecare la minor perturbazione possibile al sedimento. A tal fine, si può aggiungere un mezzo con un imbuto o un disco di plastica per coprire il sedimento mentre viene versato nei recipienti di prova, a condizione che il disco sia rimosso subito dopo. In alternativa, i vasi che contengono le piante possono essere inseriti nei recipienti di prova dopo l'aggiunta del mezzo. In entrambi i casi, si può usare un mezzo nuovo all'inizio della fase di esposizione, se necessario per ridurre al minimo il possibile accumulo di alghe e batteri o per consentire la preparazione dei singoli lotti di soluzione di prova nelle varie repliche.

49. La lunghezza del germoglio che spunta oltre il sedimento è misurata prima o dopo l'aggiunta del mezzo.

50. La quantità pertinente di sostanza chimica in esame può essere aggiunta al mezzo di prova prima che questo sia inserito nei recipienti di prova. In alternativa, la sostanza chimica in esame può essere introdotta nel mezzo di prova dopo che quest'ultimo sarà inserito nei recipienti di prova. In questo caso è necessario accertarsi che la sostanza chimica in esame sia perfettamente e omogeneamente distribuita nel sistema di prova senza perturbazione del sedimento.

51. In ogni caso l'aspetto (per esempio chiaro, torbido, ecc.) del mezzo di prova è registrato a inizio prova.

Esposizione tramite il sedimento

52. I sedimenti addizionati, alla concentrazione desiderata, vengono preparati aggiungendo una soluzione della sostanza chimica in esame direttamente al sedimento nuovo. 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 circa 10 g di sabbia quarzosa fine per ciascun recipiente di prova. Il solvente viene fatto evaporare e la sabbia va poi mescolata alla quantità di sedimento idonea tramite becher di prova. Per solubilizzare, disperdere o emulsionare la sostanza chimica in esame, si possono impiegare soltanto agenti che volatilizzano rapidamente. Occorre tener conto che il rapporto volume/peso della sabbia cui è stata aggiunta la sostanza chimica in esame va considerato nella preparazione finale del sedimento (ossia, il sedimento va quindi preparato utilizzando meno sabbia). Occorre fare attenzione affinché la sostanza chimica in esame aggiunta al sedimento sia perfettamente e omogeneamente distribuita al suo interno.

53. Il sedimento addizionato viene introdotto nei vasi (come descritto sopra). Le piante, selezionate con criterio di uniformità e con un adeguato sistema di radici, sono rimosse dai vasi usati nella fase di impianto e trapiantate nel sedimento addizionato come descritto sopra.

54. I vasi sono inseriti nei recipienti di prova come richiesto dal disegno sperimentale. Il mezzo di prova di Smart e Barko è in seguito aggiunto accuratamente (ossia utilizzando un imbuto), al fine di evitare perturbazioni del sedimento. La lunghezza del germoglio che spunta oltre il sedimento è misurata prima o dopo l'aggiunta del mezzo.

▼M7

Mantenimento del livello dell'acqua nel corso della prova

55. Il volume finale di acqua deve essere registrato e il livello dell'acqua va segnato su ciascun recipiente di prova. Se l'acqua evapora durante la prova in una misura superiore al 10 %, il livello dell'acqua deve essere regolato con acqua distillata. Se necessario, i becher possono essere coperti in maniera non ermetica da un involucro trasparente, ad esempio da coperchi di plastica, per minimizzare l'evaporazione e la contaminazione con spore di alghe.

Condizioni di prova

56. Occorre fornire un'illuminazione a fluorescenza bianca, calda o fredda, al fine di ottenere un'intensità luminosa di circa 140 (± 20) $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$, misurata in una radiazione fotosinteticamente attiva (400-700 nm) alla superficie dell'acqua, e con un ciclo luce-buio di 16:8 ore. L'irradiazione di luce misurata alla superficie dell'area di prova non può scostarsi di oltre ± 15 % dai valori scelti.

57. La temperatura nei recipienti di prova è essere mantenuta a 20 (± 2) °C.

58. 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 la prova se il rispetto dei criteri di validità specificati in precedenza può essere dimostrato.

Durata della prova

59. La durata di esposizione è di 14 giorni.

Misure e determinazioni analitiche

60. Dopo la fase di impianto e immediatamente prima del trattamento (ossia al giorno 0), vengono raccolte, ai fini di valutazione della lunghezza del germoglio e del peso fresco e secco come descritto di seguito, le piante di riserva provenienti da cinque vasi scelti a caso (per il disegno sperimentale che prevede tre piante per vaso) oppure 15 vasi (per il disegno sperimentale che prevede una pianta per vaso).

61. Per le piante immesse nella fase di esposizione, si eseguono le seguenti valutazioni come indicato nella tabella 1:

— le valutazioni relative alla lunghezza del germoglio principale e al numero e alla lunghezza dei germogli laterali sono registrate almeno alla fine del periodo di esposizione (ad esempio al giorno 14);

— le valutazioni visive della salute delle piante sono registrate almeno tre volte durante il periodo di esposizione (ad esempio al giorno 0, 7 e 14);

— le valutazioni del peso fresco e del peso secco dei germogli sono effettuate a fine prova (ad esempio al giorno 14).

62. La lunghezza dei germogli è misurata con un righello. Se sono presenti germogli laterali, vanno contati e va misurata la loro lunghezza.

63. Le valutazioni visive della salute delle piante sono effettuate tramite la registrazione dell'aspetto delle piante e dello stato generale del mezzo di prova. Le osservazioni di cui prendere nota riguardano:

— necrosi, clorosi e altre decolorazioni come eccessivo arrossamento rispetto alle piante di controllo.

— Sviluppo di batteri o contaminazione da alghe;

— Anomalie della crescita, ad esempio ritardi nella crescita, alterazione dell'intervallo tra i due nodi, malformazioni dei germogli/delle foglie, proliferazione di germogli laterali, perdita di foglie, abbassamento del turgore e frammentazione del fusto.

▼M7

— Le valutazioni visive dello stato di salute delle radici si svolgono a fine prova, lavando accuratamente le radici per rimuovere il sedimento per consentire l'osservazione dell'apparato radicale. Segue una proposta di scala di valutazione relativa alle piante di controllo:

1) assenza di radici

2) poche radici

3) sviluppo moderato delle radici

4) sviluppo molto buono delle radici, analogo a quello delle piante di controllo

64. Le valutazioni di peso fresco vengono effettuate a inizio e fine prova tagliando il germoglio al livello del sedimento e asciugandolo in carta assorbente prima della pesata. Occorre prestare attenzione a rimuovere le particelle di sedimento che potrebbero aver aderito alla base del germoglio. I germogli sono in seguito inseriti in un forno di essiccamento a circa 60°C e asciugati a peso costante, prima della nuova misurazione del peso che consente di rilevare il peso secco.

65. La tabella 1 fornisce una sintesi delle valutazioni biologiche minime richieste durante la durata della prova.

Tabella 1

Protocollo di valutazione

Giorno dopo il trattamento (DBP)	*Myriophyllum spicatum*			
	Lunghezza del germoglio, numero e lunghezza dei germogli laterali	Valutazione visiva dei germogli	Peso fresco e secco del germoglio Valutazione visiva delle radici	pH O_2
0	V	V	V	V
4	-	—	—	—
7	-	V	—	V
14	V	V	V	V

V: indica che in questi casi sono richieste misurazioni
—: indica che non sono richieste misurazioni

Frequenza delle misurazioni e determinazioni analitiche

66. La temperatura del mezzo è misurata almeno una volta al giorno in un recipiente di prova supplementare conservato nelle stesse condizioni degli altri nella stanza di crescita, l'incubatore o la stanza.

67. Il pH e la concentrazione dell'ossigeno disciolto del mezzo di prova devono essere controllati a inizio prova, almeno una volta nel corso della prova e a fine prova in tutte le repliche. In ciascun caso, le misurazioni devono essere effettuate nella stessa ora del giorno. Se per la preparazione di tutte le repliche di ogni concentrazione di prova è usata un'unica soluzione per recipiente (*bulk solution*), è ammesso procedere a un'unica misurazione di ciascuna soluzione al giorno 0.

68. L'irradiazione è misurata nella camera di crescita, nell'incubatore o nella stanza in punti situati allo stesso livello della superficie dell'acqua. Tali misurazioni devono essere effettuate almeno una volta a inizio prova o durante la prova. Il metodo di individuazione e misurazione della luce, in particolare il tipo di sensore, inciderà sul valore misurato. I sensori sferici

▼M7

(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 al di sopra del piano di misurazione) sono preferibili ai sensori unidirezionali e indicheranno valori più elevati per una fonte luminosa multipla come quella qui descritta.

Misurazioni analitiche della sostanza chimica in esame

69. La corretta applicazione della sostanza chimica in esame va scelta in base alle misurazioni analitiche delle concentrazioni della sostanza chimica in esame.

70. I campioni di acqua sono raccolti ai fini dell'analisi della sostanza chimica in esame poco dopo l'inizio della prova (vale a dire il giorno dell'applicazione per sostanze chimiche in esame stabili o un'ora dopo l'applicazione per sostanze chimiche in esame non stabili) e al termine della prova per tutte le concentrazioni di prova.

71. Le concentrazioni nel sedimento e nell'acqua interstiziale del sedimento sono determinate a inizio e fine prova, almeno alla concentrazione più elevata, a meno che non sia noto che le sostanze chimiche in esame sono stabili nell'acqua ((> 80 % del valore nominale). Non è necessario analizzare il sedimento e l'acqua interstiziale 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, metodo di applicazione, tipo di sedimento).

72. Il prelievo di campioni di sedimento a inizio prova può perturbare l'impianto sperimentale. Di conseguenza, può essere necessario disporre di ulteriori recipienti di prova trattati per agevolare le determinazioni analitiche a inizio e fine prova. Analogamente, ove sia ritenuto necessario effettuare valutazioni intermedie, ossia al giorno 7, e le analisi richiedano numerosi campioni di sedimento che non possono essere facilmente rimossi dal sistema, occorre che le determinazioni analitiche siano svolte utilizzando recipienti di prova supplementari trattati allo stesso modo di quelli usati per le valutazioni biologiche.

73. Per isolare l'acqua interstiziale si raccomanda una centrifugazione, ad esempio a 10 000 g e a 4 °C per 30 minuti. Se però è dimostrato che la sostanza chimica in esame non adsorbe sui filtri, è accettabile anche la filtrazione. In alcuni casi, se i campioni sono troppo piccoli, può rivelarsi impossibile analizzare le concentrazioni nell'acqua interstiziale.

74. Nelle prove semistatiche (in cui l'esposizione avviene attraverso la fase acquatica) in cui non si prevede che la concentrazione della o delle sostanze chimiche in esame rimanga entro il 20 % della concentrazione nominale nel corso della prova senza rinnovo delle soluzioni di prova, a ciascun rinnovo è necessario campionare le soluzioni di prova usate e appena preparate ai fini dell'analisi della concentrazione della sostanza chimica in esame.

75. Nei casi in cui la concentrazione della sostanza chimica in esame misurata inizialmente non si situa entro il 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 il 120 % della concentrazione iniziale), le determinazioni chimiche possono limitarsi solo alla concentrazione di prova più alta e a quella più bassa.

76. In tutti i casi la determinazione delle concentrazioni della sostanza chimica in esame può limitarsi ad un unico recipiente per ciascuna concentrazione. In alternativa, le soluzioni di prova di tutte le repliche di ciascuna concentrazione possono essere riunite per l'analisi.

77. Se è comprovato che la concentrazione della sostanza chimica in esame si è mantenuta nel corso dell'intera prova entro il 20 % della concentrazione nominale o della concentrazione misurata all'inizio, l'analisi dei risultati e le conseguenze sugli effetti studiati possono basarsi sui valori nominali o sui valori misurati all'inizio.

▼M7

78. In questi casi, le concentrazioni che determinano un effetto sono basate su misurazioni nominali o misurate delle concentrazioni nell'acqua a inizio prova.

79. Tuttavia, in presenza di un calo comprovato della concentrazione (ossia nel caso in cui il valore non è rimasto entro il 20 % della concentrazione iniziale nominale o misurata nel comparto trattato) nel corso della prova, l'analisi dei risultati è basata sulla media geometrica della concentrazione durante l'esposizione o su modelli che descrivono la contrazione della concentrazione della sostanza chimica in esame nel comparto trattato (11).

VALUTAZIONE DEI DATI

80. Nei casi in cui è richiesto l'uso di un solvente/disperdente, è possibile raggruppare i dati relativi al solvente e ai controlli non trattati ai fini di analisi statistiche, a condizione che le risposte del solvente e dei controlli non trattati non siano diversi sul piano statistico.

Variabili di risposta

81. La finalità di questa prova è di determinare gli effetti della sostanza chimica in esame sulla crescita vegetativa della specie sperimentale, usando due variabili di risposa, il tasso di crescita specifico medio e il rendimento, come segue:

Tasso di crescita specifico medio

82. Questa variabile di risposta è basata sulle variazioni, nel tempo, dei valori logaritmici della lunghezza totale dei germogli, del peso fresco totale dei germogli e del peso secco totale dei germogli, nei controlli e in ciascun gruppo di trattamento. Questa variabile è calcolata per ogni replica di ciascun gruppo di trattamento e di controllo. La lunghezza media e il peso medio delle tre piante per recipiente di prova (replica) e, successivamente, il tasso di crescita per ogni replica, vanno calcolati con la seguente formula:

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

laddove:

μ_{i-j}: tasso di crescita specifico medio dal momento i al momento j

N_i: variabile di misurazione nel recipiente di prova o di controllo al momento i

N_j: variabile di misurazione nel recipiente di prova o di controllo al momento j

t: periodo di tempo tra i e j

83. In base alle risposte delle repliche, per ogni gruppo di trattamento e di controllo si calcola un valore medio di tasso di crescita con stime della varianza.

84. Occorre calcolare il tasso di crescita specifico medio per l'intero periodo di prova (il momento «i» citato nella formula corrisponde all'inizio della prova e il momento «j» corrisponde alla fine della prova). Per ciascuna concentrazione dei gruppi trattati e di controllo, calcolare il valore medio del tasso di crescita specifico medio e le stime della varianza.

▼M7

85. 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:

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

laddove:

% I_r: percentuale di inibizione del tasso di crescita specifico medio,

μ_C: valore medio di μ nel gruppo di controllo

μ_T: valore medio di μ nel gruppo trattato

Rendimento

86. Questa variabile di risposta è basata sulle variazioni, nel tempo, della lunghezza totale dei germogli, del peso fresco totale dei germogli e del peso secco totale dei germogli, nei controlli e in ciascun gruppo di trattamento Per ogni gruppo trattato la percentuale media di inibizione del rendimento (% I_y) può essere calcolata secondo la formula seguente:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

laddove:

% I_y: percentuale di riduzione del rendimento,

b_C: biomassa finale meno la biomassa di partenza nel gruppo di controllo

b_T: biomassa finale meno la biomassa di partenza nel gruppo trattato

Tracciato delle curve concentrazione-risposta

87. Occorre tracciare curve concentrazione-risposta che raffigurino la percentuale d'inibizione media della variabile di risposta (I_r oppure I_y calcolate come indicato qui sopra) e il logaritmo della concentrazione della sostanza chimica in esame.

Stima del valore EC_x

88. Le stime del valore EC_x (ad es. EC_{50}) devono basarsi sia sul tasso di crescita specifico medio (E_rC_x), sia sul rendimento (E_yC_x), e ciascuna di queste variabili in esame deve essere a sua volta basata sul peso fresco totale dei germogli, sul peso secco totale dei germogli e sulla lunghezza totale dei germogli.

89. Occorre rilevare che i valori di EC_x calcolati utilizzando queste due variabili di risposta non sono comparabili e che occorre tenere conto di questa differenza quando si utilizzato i risultati della prova. I valori EC_x basati sul tasso di crescita specifico medio (E_rC_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 interpretata come una differenza di sensibilità tra le due variabili in esame.

Procedure statistiche

90. L'obiettivo è ottenere una relazione quantitativa concentrazione-risposta mediante un'analisi della regressione. È possibile utilizzare una regressione lineare ponderata, preceduta da una trasformazione linearizzante 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

▼M7

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 di EC_x a partire da dati continui si vedano i riferimenti (14) (15) (16) (17).

91. Per ciascuna variabile di risposta da analizzare, occorre utilizzare il rapporto concentrazione-risposta per calcolare stime puntuali dei valori EC_x. Gli intervalli di confidenza a 95 % sono determinati per ogni stima e la validità dei dati che descrivono gli effetti rispetto al modello di regressione è valutata graficamente o statisticamente. L'analisi della regressione deve essere effettuata basandosi sulle reazioni rilevate in ogni recipiente replicato e non sulle medie dei gruppi trattati.

92. Le stime di EC_{50} e gli intervalli di confidenza possono essere ottenuti anche mediante interpolazione lineare con *bootstrapping* (18), se i modelli o i metodi di regressione disponibili non sono adatti ai dati.

93. Per stimare la LOEC, e dunque la NOEC, è necessario paragonare le medie dei gruppi trattati mediante un'analisi della varianza (ANOVA). La media di ogni concentrazione è poi confrontata con la media dei controlli mediante un metodo adeguato (ad es. con i test di Dunnet, Williams) (19) (20) (21) (22). È necessario controllare se l'ipotesi di distribuzione normale e di omogeneità della varianza dell'ANOVA è fondata. Tale valutazione dovrebbe essere effettuata con un test di Shapiro-Wilks (per la distribuzione normale) o di Levene (per l'analisi della varianza). Se l'ipotesi della distribuzione normale e dell'omogeneità della varianza non si conferma, a volte si possono correggere i dati mediante una trasformazione logaritmica. Se l'eterogeneità della varianza e/o la deviazione dalla distribuzione normale è estrema e non può essere corretta mediante una trasformazione, si prenderanno in considerazione metodi di come, ad esempio, il test-t di Bonferroni-Welch, il test di tendenza regressiva di Jonkheere Terpstra e il test della mediana di Bonferroni. Ulteriori riferimenti sulla determinazione della NOEC sono reperibili al riferimento 16.

RELAZIONI

94. La relazione della prova deve comprendere le seguenti informazioni dettagliate:

Sostanza chimica in esame

Sostanza mono-costituente

— apparenza fisica, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;

— identificazione chimica, come la denominazione IUPAC o CAS, il numero CAS, il codice SMILES o InChI, la formula strutturale, l'identità chimica o impurità, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc.

Sostanza multi-costituente, UVCB e miscele:

— caratterizzata nella massima misura possibile con l'identità chimica (vedasi sopra), con la presenza quantitativa e con le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti.

Specie in esame

— nome scientifico e fonte.

Condizioni di prova

— durata e condizioni della fase di impianto;

— procedura sperimentale utilizzata (statica, semistatica o a impulsi);

▼M7

— data di inizio e durata della prova,

— mezzo di prova, vale a dire il sedimento e il mezzo nutritivo liquido;

— descrizione del disegno sperimentale: camera/stanza di crescita o laboratorio, recipienti di prova e coperchi, volumi delle soluzioni, lunghezza e peso delle piante sperimentali per recipiente di prova a inizio prova, rapporto tra superficie del sedimento e superficie dell'acqua, rapporto tra volume del sedimento e volume dell'acqua;

— 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;

— sorgente di luce, intensità luminosa ($\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$);

— valori del pH dei mezzi di prova e di controllo, nonché aspetto dei mezzi di prova all'inizio e alla fine della stessa;

— concentrazioni di ossigeno;

— metodo di analisi e dati adeguati per la valutazione della qualità (studi di convalida, scarti tipo o intervalli di confidenza delle analisi);

— metodi per la determinazione delle variabili di misurazione, ad esempio lunghezza, peso secco, peso fresco;

— tutte le differenze rispetto al presente metodo di prova.

Risultati

— dati grezzi: lunghezza e peso del germoglio principale delle piante/all'interno del vaso e altre variabili di misurazione in ciascun recipiente di prova e di controllo per ciascuna osservazione e analisi, conformemente al protocollo di valutazione di cui alla tabella 1;

— medie e scarti tipo per ciascuna variabile di misurazione;

— curve di crescita per ciascuna concentrazione;

— tempio di raddoppio/tasso di crescita dei controlli in base alla lunghezza dei germogli e al peso fresco, compreso il coefficiente di varianza del rendimento del peso fresco;

— 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: ad esempio EC_{50}, e relativi intervalli di confidenza. Se calcolate, la LOEC e/o la NOEC e i metodi statistici utilizzati per determinarle;

— se è stata praticato un test ANOVA, la portata dell'effetto individuabile (per esempio, la differenza meno significativa);

— eventuali stimoli della crescita osservati in qualsiasi gruppo trattato;

▼M7

— eventuali segni di fitotossicità e osservazioni delle soluzioni di prova;

— discussione dei risultati, comprese le eventuali ripercussioni sui risultati dovute allo scostamento dal presente metodo di prova.

BIBLIOGRAFIA

(1) Capitolo C.26 del presente allegato*, Prova di inibizione della crescita di specie di Lemna.*

(2) Capitolo C.3 del presente allegato, Alghe di acqua dolce e cianobatteri, prova di inibizione della crescita.

(3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008.

(4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, pp. 199-206.

(5) ISO 16191:2013 Water quality — Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of Myriophyllum aquaticum.

(6) Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, Vol. 62/8, pp. 715-722.

(7) Capitolo B.50 del presente allegato, Prova di tossicità sul *Myriophyllum spicatum* in un sistema di prova senza sedimento.

(8) Capitolo B.28 del presente allegato, Prova di tossicità su chironomidi in sedimento-acqua con acqua addizionata

(9) Ratte, M., H. Ratte (2014), «Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using M. aquaticum and M. spicatum grown in a water-sediment system», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris.

(10) Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron — a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, pp. 231 — 237.

(11) 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.

(12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, Vol. 21/3, pp. 251-263.

(13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, Vol. 18/9, pp. 713-718.

(14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/2, pp. 157-167.

(15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/10, 1485-1494.

(16) OCSE (2006), «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

(17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, Vol. 29/2, pp/93-96.

▼**M7**

(18) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of the American Statistical Association, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

(20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, Vol. 20/3, pp. 482-491.

(21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, Vol. 28/2, pp. 519-531.

▼**M7**

Appendice 1

COMPOSIZIONE DEL MEZZO DI PROVA DI SMART E BARKO

Componente	Quantitativo di reagente aggiunto all'acqua (*) (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	91,7
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	69,0
$NaHCO_3$	58,4
$KHCO_3$	15,4
pH (equilibrio atmosferico)	7,9

(*) acqua demineralizzata (vale a dire distillata o deionizzata)

▼M7

Appendice 2

DEFINIZIONI

Biomassa: peso fresco e/o secco della materia vivente presente in una popolazione. Nella presente prova la biomassa comprende il germoglio principale, tutti i rami laterali e tutte le radici.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Clorosi: il cambiamento di colore di un organismo di prova, in particolare dei germogli, dal verde a un colore tendente al giallo.

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 *Myriophyllum spicatum* 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 (lunghezza del germoglio principale).

Crescita: aumento della variabile di misurazione, ad esempio la lunghezza del germoglio principale, la lunghezza totale dei rami laterali, la lunghezza totale dei germogli, la lunghezza totale delle radici, il peso fresco, il peso secco o il numero di verticilli, nel corso del periodo di prova.

Tasso di crescita: (tasso di crescita specifico medio): aumento logaritmico della variabile di misurazione durante il periodo di esposizione. *Nota:* La risposta relativa al tasso di crescita è indipendente dalla durata della prova a condizione che gli organismi di controllo non esposti siano soggetti a un andamento di crescita esponenziale.

Concentrazione minima a cui si osserva un effetto statisticamente significativo (LOEC — *Lowest Observed Effect Concentration*): la concentrazione più bassa saggiata 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. 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).

Variabile di misurazione: qualsiasi tipo di variabile che viene misurata per esprimere l'endpoint della prova utilizzando una o più variabili di risposta. Nella presente prova le variabili di misurazione consistono nella lunghezza del germoglio principale, nella lunghezza totale dei rami laterali, nella lunghezza totale dei germogli, nella lunghezza totale delle radici, nel peso fresco, nel peso secco e nel numero di verticilli.

Monocultura: coltura con una sola specie vegetale.

Necrosi: tessuto morto (ossia di aspetto bianco o marrone scuro) dell'organismo di prova.

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

Variabile di risposta: la variabile per la stima della tossicità derivata da qualsiasi parametro misurato che descrive la biomassa mediante metodi diversi di calcolo. Nel presente metodo di prova, il tasso e il rendimento di crescita sono variabili di risposta derivate dalle variabili di misurazione come la lunghezza del germoglio principale, la lunghezza totale dei germogli, il peso fresco, il peso secco o il numero di verticilli.

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

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

▼M7

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

Endpoint della prova: indica il fattore generale che sarà modificato, rispetto al controllo, dalla sostanza chimica in esame. Nel presente 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.

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

UVCB: una sostanza di composizione sconosciuta o variabile, il prodotto di una reazione complessa o materiale biologico.

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. Nota: quando l'andamento della crescita è esponenziale, le variabili di risposta basate sul rendimento diminuiscono con l'aumento della durata della prova.

▼**M8**

C.52. **PROVA ESTESA DI RIPRODUZIONE SU UNA GENERAZIONE DI MEDAKA (MEOGRT)**

▼**M10**

La descrizione completa del presente metodo di prova è stata soppressa. Il metodo di prova internazionale equivalente figura nella tabella 3 della parte 0.

▼M8

C.53. METODO DI PROVA SULLA CRESCITA E LO SVILUPPO DELLE LARVE DI ANFIBIO (LAGDA)

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE n. 241 (2015). La necessità di sviluppare e validare un protocollo sperimentale in grado di individuare e di caratterizzare le conseguenze dannose dell'esposizione a sostanze chimiche tossiche negli anfibi 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. La linea guida dell'OCSE per il saggio sulla crescita e lo sviluppo delle larve di anfibio (*Larval Amphibian Growth and Development Assay* - LAGDA) descrive prove di tossicità condotte su una specie di anfibi che considerano la crescita e lo sviluppo dalla fecondazione fino all'inizio dello stadio giovanile, valutando (nel corso di 16 settimane, in genere) lo sviluppo iniziale, la metamorfosi, la sopravvivenza, la crescita e la maturazione parziale del sistema riproduttivo. Esso consente inoltre di misurare una serie di altri endpoint in vista della valutazione diagnostica di sostanze chimiche sospettate di essere interferenti endocrini o di altri tipi di sostanze con effetti tossici sullo sviluppo e sulla riproduzione. Il metodo descritto nel presente metodo di prova si ispira ai lavori di validazione condotti sulla rana della specie *Xenopus laevis* (Xenopo liscio o rana artigliata africana) da parte dell'Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti (U.S. EPA), con il sostegno del Giappone (1). Altre specie di anfibi possano essere utilizzate nelle prove sulla crescita e lo sviluppo intese a determinare se il sesso genetico sia una componente importante, tuttavia i metodi specifici e gli endpoint di osservazione dettagliati nel presente metodo di prova si applicano esclusivamente a *Xenopus laevis*.

2. Il LAGDA funge da prova di livello superiore sugli anfibi intesa a raccogliere informazioni più complete sulle relazioni concentrazione-risposta che inducono effetti nocivi; informazioni che possono essere successivamente utilizzate per identificare e caratterizzare i pericoli e per valutare il rischio ecologico. Il metodo di prova si colloca al livello 4 del Quadro concettuale dell'OCSE per le prove e la valutazione delle sostanze che alterano il sistema endocrino; in tale contesto, le prove *in vivo* forniscono inoltre dati relativi agli effetti nocivi sugli endpoint pertinenti per il sistema endocrino (2). Il progetto sperimentale generale comporta l'esposizione di embrioni di *X. laevis* allo stadio di sviluppo 8-10 secondo Nieuwkoop e Faber (NF) (3) a un minimo di quattro diverse concentrazioni della sostanza chimica in esame (distanziate generalmente a intervalli definiti secondo una progressione semi-logaritmica) e uno o più controlli fino a 10 settimane dopo il tempo mediano trascorso fino allo stadio NF62 nel controllo, con un sottocampione intermedio allo stadio NF62 ($\leq$ 45 giorni dopo la fecondazione; di norma circa 45 giorni (dpf). Per ciascuna concentrazione di prova sono testate quattro repliche, con otto repliche per il controllo. Gli endpoint valutati nel corso dell'esposizione (nel sottocampione intermedio e nel campione finale al completamento della prova) includono gli indicatori di tossicità generalizzata: la mortalità, il comportamento anomalo e gli indicatori di crescita (lunghezza e peso), nonché gli endpoint intesi a caratterizzare i meccanismi di azione della tossicità che colpiscono i processi fisiologici mediati dagli estrogeni, dagli androgeni o dalla tiroide. Il metodo mira in via prioritaria ad evidenziare i potenziali effetti sulla popolazione (vale a dire gli effetti negativi su sopravvivenza, sviluppo, crescita e sviluppo riproduttivo) al fine di calcolare la concentrazione senza effetti osservabili (NOEC) o la concentrazione che induce una variazione dell'x % (EC_x) nell'endpoint misurato. Giova notare che gli approcci di tipo EC_x sono raramente adatti per ampi studi di questo tipo, in cui l'aumento del numero di concentrazioni di prova per determinare l'ECx desiderato può risultare impraticabile. Inoltre, il metodo non si applica alla fase di riproduzione propriamente detta. Le definizioni dei termini utilizzati nel presente metodo di prova figurano nell'appendice 1.

CONSIDERAZIONI INIZIALI E LIMITI

3. A motivo del numero limitato di sostanze chimiche testate e di laboratori coinvolti nella validazione di questo metodo di prova piuttosto complesso (in particolare la riproducibilità inter-laboratori non è finora documentata da dati

▼M8

sperimentali), si può prevedere che la linea guida n. 241 dell'OCSE sarà rivista e, se necessario, aggiornata quando sarà disponibile un numero sufficiente di studi per verificare l'impatto di questo nuovo disegno sperimentale. Il LAGDA è un importante protocollo sperimentale che permette di studiare i potenziali fattori che contribuiscono al declino della popolazione di anfibi valutando gli effetti dell'esposizione alle sostanze chimiche durante il delicato stadio larvale, in cui gli effetti sulla sopravvivenza e sullo sviluppo, compreso lo sviluppo normale degli organi riproduttivi, possono avere ripercussioni negative sulle popolazioni.

4. La prova è intesa a individuare gli effetti apicali risultanti dai meccanismi endocrini e non endocrini e comprende gli endpoint diagnostici che sono, in parte, specifici dei principali meccanismi di azione endocrini. Si noti che prima dell'elaborazione del LAGDA non esisteva alcuna prova validata che considerasse questa funzione per gli anfibi.

5. Prima di iniziare la conduzione della prova, è importante disporre di informazioni sulle proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica in esame, in particolare per poter produrre soluzioni chimiche stabili. È inoltre necessario disporre di un metodo analitico sufficientemente sensibile per verificare le concentrazioni della sostanza chimica in esame. Per una durata di circa 16 settimane, il protocollo necessita in totale di 480 animali, cioè embrioni di *X. laevis* (o di 640 embrioni se si utilizza un controllo con solvente) per garantire che la prova sia sufficientemente potente per valutare gli endpoint osservati a livello della popolazione, quali la crescita, lo sviluppo e la maturazione riproduttiva.

6. Prima di utilizzare il metodo di prova per testare una miscela a fini regolamentari, occorre verificare se esso genererà risultati accettabili nel quadro regolamentare previsto. Inoltre, il presente metodo di prova non valuta direttamente la fecondità e quindi può non essere applicabile ad una fase più avanzata del livello 4 del quadro concettuale dell'OCSE.

FONDAMENTO SCIENTIFICO DEL METODO DI PROVA

7. Gran parte delle conoscenze di cui disponiamo in materia di biologia degli anfibi è stata ottenuta utilizzando la specie di laboratorio *X. laevis*. Questa specie può essere generalmente allevata in laboratorio; l'ovulazione può essere indotta mediante gonadotropina corionica umana (hCG) e gli stock di animali sono facilmente disponibili presso fornitori commerciali.

8. Come tutti i vertebrati, la riproduzione degli anfibi è controllata dall'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (asse HPG) (4). Gli estrogeni e gli androgeni sono mediatori di questo sistema endocrino: controllano lo sviluppo e la fisiologia dei tessuti sessualmente dimorfici. Il ciclo di vita degli anfibi comporta tre distinte fasi in cui l'asse è particolarmente attivo: 1) la differenziazione delle gonadi durante lo sviluppo larvale; 2) lo sviluppo di caratteristiche sessuali secondarie e la maturazione delle gonadi nella fase giovanile; e 3) la riproduzione funzionale degli adulti. In ciascuna di queste tre fasi di sviluppo il sistema endocrino può potenzialmente essere alterato da alcune sostanze chimiche, quali gli estrogeni e gli androgeni, con la conseguenza di perdita di capacità riproduttiva degli organismi.

9. Le gonadi iniziano lo sviluppo nello stadio NF43, quando inizia a formarsi la cresta genitale bipotenziale. La differenziazione delle gonadi inizia a partire dallo stadio NF52, quando le cellule germinali primordiali migrano verso il tessuto medullare (maschi) o rimangono nella regione corticale (femmine)

▼M8

delle gonadi in sviluppo (3). La prima relazione che dimostra che questo processo di differenziazione sessuale delle gonadi è sensibile all'azione delle sostanze chimiche nella specie *Xenopus* risale agli anni 1950 (5) (6). L'esposizione di girini all'estradiolo durante questo periodo di differenziazione delle gonadi dà luogo a inversione sessuale dei maschi che, quando raggiungono l'età adulta, diventano femmine perfettamente funzionali (7) (8). Anche l'inversione funzionale sessuale delle femmine in maschi è possibile ed è stata riportata dopo l'impianto di tessuti testicolari nei girini (9). Tuttavia, sebbene anche l'esposizione a un inibitore dell'aromatasi determini l'inversione funzionale del sesso nella specie *X. tropicalis* (10), tale effetto non è stato osservato in *X. laevis*. Storicamente, gli effetti tossici sulla differenziazione delle gonadi sono stati valutati mediante l'esame istologico delle gonadi al momento della metamorfosi e l'inversione sessuale poteva essere determinata soltanto mediante analisi del rapporto numerico tra i sessi. Fino a tempi recenti non esisteva alcun modo per determinare direttamente il sesso genetico della specie *Xenopus*. Tuttavia, la recente introduzione di marcatori sessuali nel *X. laevis* consente di determinare il sesso genetico e di individuare direttamente gli animali che hanno subito un cambiamento di sesso (11).

10. Nei giovani maschi, lo sviluppo procede man mano che aumentano i livelli di testosterone nel sangue, corrispondenti allo sviluppo dei caratteri sessuali secondari e dei testicoli. Nelle femmine, l'estradiolo è prodotto dalle ovaie, il che provoca l'apparizione della vitellogenina (VTG) nel plasma, degli oociti vitellogenici nelle ovaie e lo sviluppo di ovidotti (12). Gli ovidotti sono caratteri sessuali secondari femminili che intervengono nella maturazione degli ovociti durante la riproduzione. Gli oociti si ricoprono di un involucro gelatinoso mentre transitano lungo l'ovidotto e si accumulano nell'ovisacco, pronti per la fecondazione. Lo sviluppo dell'ovidotto sembra essere regolato dagli estrogeni, poiché è correlato ai livelli di estradiolo nel sangue nelle specie *X. laevis* (13) e *X. tropicalis* (12). È stato segnalato lo sviluppo di ovidotti nei maschi a seguito di esposizione ai composti di policlorobifenili (14) e di 4-*terz*-ottilfenolo (15).

PRINCIPIO DELLA PROVA

11. Il disegno sperimentale implica l'esposizione per via acquatica di embrioni di *X. laevis* allo stadio di sviluppo NF8-10 a quattro diverse concentrazioni della sostanza chimica in esame e uno o più controlli fino a 10 settimane dopo il tempo mediano trascorso fino allo stadio NF62 nel controllo, con un sottocampione intermedio allo stadio NF62. Anche se può essere possibile somministrare sostanze chimiche fortemente idrofobe anche per via alimentare, finora esistono poche prove che hanno utilizzato questo canale di esposizione. Per ciascuna concentrazione di prova sono testate quattro repliche, con otto repliche per ciascun controllo utilizzato. Gli endpoint valutati nel corso dell'esposizione comprendono quelli che costituiscono indicatori di tossicità generalizzata (ossia, la mortalità, il comportamento anomalo e gli indicatori di crescita (lunghezza e peso), nonché gli endpoint intesi a caratterizzare i meccanismi di azione della tossicità che colpiscono i processi fisiologici mediati dagli estrogeni, dagli androgeni o dalla tiroide (ossia, istopatologia della tiroide, istopatologia delle gonadi e del condotto gonadico, sviluppo anomalo, vitellogenina nel plasma (facoltativo) e rapporti numerici tra sessi genotipici/fenotipici).

CRITERI DI VALIDITÀ DELLA PROVA

12. Affinché la prova sia valida devono essere soddisfatti i seguenti criteri:

— la concentrazione dell'ossigeno disciolto è di ≥ 40 % del valore di saturazione in aria per tutta la durata della prova;

▼M8

— la temperatura dell'acqua si situa nell'intervallo di 21 ± 1 °C e i differenziali tra le repliche e tra i trattamenti non superano 1,0 °C;

— il pH della soluzione di prova è mantenuto tra 6,5 e 8,5 e i differenziali tra le repliche e tra i trattamenti non superano 0,5;

— 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;

— la mortalità nel periodo di esposizione è ≤ 20 % in ciascuna replica nei controlli;

— la vitalità è ≥ 70 % nelle uova selezionate per avviare lo studio;

— il tempo mediano verso lo stadio NF62 dei controlli è di ≤ 45 giorni.

— Il peso medio degli organismi di prova allo stadio NF62 e al completamento della prova nei controlli e nei controlli con solvente (se utilizzati) raggiunge rispettivamente 1,0 ± 0,2 e 11,5 ± 3 g.

13. Sebbene non sia un criterio di validità, si raccomanda che per l'analisi siano disponibili almeno tre livelli di trattamento con tre repliche non compromesse. Una mortalità eccessiva, tale da compromettere un trattamento, è definita come > 4 decessi (> 20 %) in 2 o più repliche che non possono essere spiegati da errori tecnici. Almeno tre livelli di trattamento privi di tossicità evidente sono disponibili per l'analisi. I segni di tossicità evidente possono comprendere, a titolo esemplificativo ma non esaustivo, animali che galleggiano in superficie, giacciono sul fondo della vasca, nuotano in modo irregolare o inverso, non risalgono in superficie, non rispondono agli stimoli, presentano anomalie morfologiche (ad. es. deformità degli arti), lesioni emorragiche e edema addominale.

14. Se si osserva una deviazione rispetto ai criteri di validità della prova, le conseguenze vanno analizzate in relazione all'attendibilità dei risultati della prova; tali deviazioni e considerazioni vanno documentate nella relazione sulla prova.

DESCRIZIONE DEI METODI

Strumentazione

15. Normale attrezzatura da laboratorio e in particolare:

(a) Apparecchio di controllo della temperatura (ad es. dispositivi di riscaldamento o raffreddamento regolabili a 21 ° ± 1 °C);

▼M8

(b) termometro;

(c) microscopio binoculare da dissezione e strumenti da dissezione;

(d) macchina fotografica digitale con risoluzione minima di 4 megapixel e funzione micro (se necessario);

(e) bilancia analitica, in grado di misurare fino a 0,001 mg or 1 μg;

(f) misuratore di ossigeno disciolto e pH-metro;

(g) misuratore dell'intensità luminosa in grado di fornire risultati in lux.

Acqua

Provenienza e qualità

16. Può essere usata l'acqua di diluizione disponibile localmente (ad esempio: acqua di sorgente o acqua di rubinetto filtrata con carbone) che permetta la crescita e lo sviluppo normali dei girini di *X. laevis*; ciò deve essere comprovato da informazioni fattuali. Poiché la qualità dell'acqua può variare in modo significativo da una zona all'altra, la qualità dell'acqua è analizzata, in particolare in mancanza di dati storici sull'uso di tale acqua per allevare girini di anfibi. La misurazione di metalli pesanti (ad esempio Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), dei principali anioni e cationi (es. Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, SO_4^{2-}), di pesticidi, del carbonio organico totale e dei solidi in sospensione deve essere effettuata prima dell'inizio della sperimentazione e/o, ad esempio, ogni 6 mesi, ove sia noto che l'acqua di diluizione è di qualità relativamente costante. Alcune caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione accettabile sono elencate nell'appendice 2.

Concentrazione di iodio nell'acqua utilizzata per la prova

17. Affinché la ghiandola tiroidea possa sintetizzare gli ormoni della tiroide per sostenere la normale metamorfosi, è necessario che le larve dispongano di un apporto sufficiente di iodio, amministrato mediante una combinazione di acqua e regime alimentare. Attualmente non esistono linee guida fondate su dati empirici per quanto riguarda le concentrazioni minime di iodio nei mangimi o nell'acqua necessarie per garantire un corretto sviluppo. Tuttavia, la disponibilità di iodio può compromettere la capacità di risposta del sistema tiroideo nei confronti delle sostanze attive sulla tiroide; è risaputo che essa influenza l'attività basale della ghiandola ed è pertanto necessario prendere in considerazione questo aspetto nell'interpretazione dei risultati dell'istopatologia della tiroide. Studi precedenti hanno dimostrano che il presente protocollo funziona correttamente quando le concentrazioni di ioduro (I^-) nell'acqua di diluizione sono comprese nell'intervallo tra 0,5 e 10 μg/l. Idealmente, la concentrazione minima di iodio nell'acqua di diluizione per tutta la durata della prova è di 0,5 μg/l (aggiunto sotto forma di sale di sodio o di potassio). Quando la prova è eseguita con acqua deionizzata, si deve aggiungere un supplemento di iodio per raggiungere la concentrazione minima di 0,5 μg/l. Le concentrazioni misurate di iodio nell'acqua della prova (cioè, acqua di diluizione) e l'aggiunta di iodio o di altri sali (se utilizzati) sono riportate nella relazione. Il tenore in iodio può anche essere misurato nei mangimi, oltre che nell'acqua di prova.

Sistema di esposizione

18. La prova è stata sviluppata utilizzando un sistema di diluizione a flusso continuo. I componenti del sistema devono essere costituiti di materiale adatto al contatto con l'acqua, come il vetro, l'acciaio inossidabile e/o altri materiali chimicamente inerti. Le vasche di esposizione devono essere di vetro o di acciaio inossidabile, e il volume utilizzabile della vasca dovrebbe essere tra 4,0 e 10,0 l (con 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 e un controllo con solvente, se del caso, con quattro repliche per livello di concentrazione e otto per i controlli. La portata del flusso verso ciascuna vasca deve essere costante, in modo da mantenere stabili le condizioni biologiche e l'esposizione chimica.

▼M8

Si raccomanda di mantenere una portata dell'acqua adeguata (ad esempio almeno 5 rinnovi di acqua al giorno) per evitare un calo della concentrazione della sostanza chimica a causa del metabolismo degli organismi sperimentali e dei microrganismi acquatici presenti nell'acquario, di vie di degradazione abiotica (idrolisi, fotolisi) o della dissipazione (volatilizzazione, adsorbimento). Le vasche sperimentali vanno distribuite a caso nel sistema di esposizione, in modo da diminuire gli eventuali effetti connessi alla posizione (incluse lievi variazioni di temperatura, dell'intensità luminosa, ecc.). Ulteriori informazioni sull'installazione di sistemi di esposizione a flusso continuo possono essere ottenute dal documento *ASTM Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (16).

Somministrazione della sostanza chimica: preparazione delle soluzioni di prova

19. Per preparare le soluzioni di prova nel sistema di esposizione, si introduca nel sistema una soluzione madre della sostanza chimica in esame mediante una pompa o un altro strumento adeguato. La velocità di flusso della soluzione di riserva deve essere calibrata secondo i dati analitici relativi alle soluzioni di prova prima dell'inizio dell'esposizione, e sottoposta periodicamente a verifica volumetrica durante la prova. La soluzione di prova in ciascuna vasca va rinnovata al ritmo di un minimo di 5 rinnovi in volume/giorno.

20. Il metodo utilizzato per introdurre nel sistema la sostanza chimica in esame è variabile in funzione delle sue caratteristiche fisico-chimiche. Pertanto, prima della prova si devono ottenere informazioni di base sulla sostanza chimica che siano rilevanti per determinarne la stabilità. La formula strutturale, il peso molecolare, la purezza, la stabilità in acqua e alla luce, il pK_a e il K_{ow}, l'idrosolubilità (preferibilmente nel mezzo di prova), la pressione di vapore e i risultati di una prova di pronta biodegradabilità [metodo di prova C.4 (17) o C. 29 (18)] sono informazioni utili sulle proprietà specifiche della sostanza chimica in esame. La solubilità e la pressione di vapore possono essere utilizzate per calcolare la costante di Henry, che indica il rischio di perdite per evaporazione della sostanza chimica durante la prova. La conduzione di tale prova senza le informazioni di cui sopra deve essere considerata attentamente giacché il disegno sperimentale dipende dalle proprietà fisico-chimiche della sostanza chimica in esame e, in assenza di tali dati, i risultati possono essere di difficile interpretazione o apparire privi di senso. Occorre inoltre disporre di un metodo d'analisi affidabile per la determinazione quantitativa della sostanza chimica in esame nelle soluzioni di prova, la cui precisione e il limite di quantificazione siano noti e descritti in letteratura. Le sostanze chimiche in esame solubili in acqua possono essere disciolte in aliquote dell'acqua di diluizione ad una concentrazione che consenta di ottenere il rilascio della concentrazione sperimentale voluta mediante un sistema di flusso continuo. Le sostanze chimiche che sono liquide o solide a temperatura ambiente e moderatamente solubili in acqua possono richiedere saturatori liquido:liquido o liquido:solido (ad esempio, colonna di lana di vetro) (19). Anche se può anche essere possibile somministrare sostanze chimiche fortemente idrofobe attraverso i mangimi, esistono pochi metodi di prova che hanno utilizzato questo canale di esposizione.

21. Le soluzioni di prova alle concentrazioni scelte vanno preparate per diluizione di una soluzione madre. La soluzione madre è preparata di preferenza per semplice miscela o agitazione della sostanza chimica in esame nell'acqua di diluizione, con l'ausilio di mezzi meccanici (agitazione e/o ultrasuoni, ad esempio). Per ottenere una concentrazione adeguata della soluzione madre si possono utilizzare colonne/sistemi di saturazione o metodi di dosaggio passivo (20). Vanno privilegiati i sistemi sperimentali che non fanno uso di co-solventi; 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 fare il possibile

▼M8

per evitare solventi e altri vettori in quanto: 1) alcuni solventi stessi possono rivelarsi tossici e/o indurre risposte endocrine indesiderate o inattese; 2) 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 3) il ricorso a solventi nelle prove può portare a lungo termine alla formazione significativa di biofilm associati all'attività microbica, che può avere un impatto sulle condizioni ambientali o sulla capacità di mantenere le concentrazioni di esposizione; 4) in assenza di dati storici che dimostrino che il solvente non influenza i risultati dello studio, l'uso di solventi richiede un trattamento di controllo con solvente che ha implicazioni significative per il benessere degli animali, in quanto sono necessari altri animali per condurre la prova. 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* (21) per stabilire la migliore metodologia da seguire. La scelta del solvente è determinata dalle proprietà chimiche della sostanza chimica in esame e la disponibilità dei dati di controllo storici sui solventi. In mancanza di dati storici, occorre determinare l'idoneità di un solvente prima di procedere allo studio definitivo. Nel caso in cui l'uso di un solvente sia inevitabile e si verifichi un'attività microbica (biofilm), nel corso della prova si raccomanda di registrare/annotare nella relazione la presenza di biofilm per vasca (almeno una volta alla settimana). Idealmente, la concentrazione del solvente deve essere mantenuta costante nel controllo con solvente e in tutti i recipienti trattati. Se la concentrazione del solvente non è costante, nel controllo con solvente si deve usare la concentrazione più elevata di solvente per il trattamento. Se si utilizza un solvente come vettore, le concentrazioni massime di solventi non devono superare 100 µl/l o 100 mg/l (21) e si raccomanda di mantenere la concentrazione di solvente più bassa possibile (ad esempio, ≤ 20 µl/l) per evitare potenziali effetti del solvente sugli endpoint misurati (22).

Animali sperimentali

Specie sperimentale

22. La specie sperimentale è *X. laevis* perché: 1) è allevata regolarmente nei laboratorio di tutto il mondo; 2) è facilmente ottenibile da fornitori commerciali; e 3) si tratta di una specie di cui si può determinare il sesso genetico.

Cura e riproduzione degli adulti

23. I metodi idonei di cura e riproduzione della specie *X. laevis* sono descritti in una linea guida standardizzata (23). Le condizioni di alloggiamento e di cura di *X. laevis* sono anch'esse descritte da Read (24). Per favorire la riproduzione, le coppie (3-5) di maschi e femmine adulti ricevono un'iniezione intraperitoneale di gonadotropina corionica umana (HCG). Agli esemplari maschi e femmine vengono iniettati, rispettivamente, circa 800-1 000 UI e 500-800 UI di hCG disciolti in una soluzione salina a 0,6-0,9 % (o soluzione Ringer, una soluzione isotonica salina da utilizzare con gli anfibi). I volumi di iniezione devono essere di circa 10 µl/g di peso corporeo (~1 000 µl). Successivamente, per stimolare la copulazione, le coppie riproduttrici indotte sono mantenute in grandi vasche, al riparo da perturbazioni e in condizioni statiche. Ciascuna vasca di riproduzione è dotata di un finto doppiofondo formato da una griglia di plastica o acciaio inossidabile (ad es. con maglie di 1,25 cm) che consenta alle uova di cadere sul fondo. Le rane che ricevono un'iniezione di hCG 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. Le uova sono quindi raccolte e l'involucro gelatinoso è rimosso con trattamento di L-cisteina (23). Preparare una soluzione a 2 % di L-cisteina e adattare il pH a 8,1 con 1 M NaOH. Aggiungere questa soluzione a 21 °C in una beuta da 500 ml contenente le

▼M8

uova provenienti da un'unica deposizione e agitare delicatamente per uno o due minuti e successivamente sciacquare accuratamente 6-8 volte con acqua di coltura a 21 °C. Trasferire quindi le uova in un cristallizzatore e determinarne la vitalità, che deve essere > 70 % e gli embrioni in fase di divisione cellulare devono eventualmente presentare solo anomalie minime.

DISEGNO SPERIMENTALE

Concentrazioni di prova

24. Si raccomanda di utilizzare almeno quattro concentrazioni della sostanza chimica in esame e adeguati controlli (compresi, se necessario, controlli con solvente). In generale, si raccomanda di intervallare le concentrazioni di un fattore non superiore a 3,2.

25. Ai fini della presente prova, i risultati degli studi esistenti sugli anfibi vanno utilizzati nella misura del possibile per determinare la concentrazione massima di prova, in modo da evitare concentrazioni manifestamente tossiche. Per determinare tale concentrazione si potrà ricorrere, ad esempio, alle relazioni quantitative struttura-attività, al metodo "read-across" e ai dati degli studi esistenti sugli anfibi quali il saggio sulla metamorfosi degli anfibi, il metodo di prova C.38 (25) e il saggio *Frog Embryo Teratogenesis Assay - Xenopus* (23) e/o le prove sui pesci quali i metodi di prova C.48, C.41 e C.49 (26) (27) (28). Prima di avviare il LAGDA si può effettuare un esperimento di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni (*range-finding*). Si raccomanda che l'esposizione per la determinazione dell'intervallo di concentrazioni sia avviata entro 24 ore dalla fecondazione e continuata per 7-14 giorni (o più, se necessario) e le concentrazioni di prova siano tali che gli intervalli tra le concentrazioni di prova non siano superiori a un fattore 10. L'intervallo di concentrazioni ottenuto servirà a stabilire la concentrazione massima di prova nel LAGDA. Si noti che, se si utilizza un solvente, l'idoneità del solvente (cioè se può avere un impatto sull'esito dello studio) potrebbe essere determinata nel quadro del test di *range-finding*.

Repliche all'interno dei gruppi di trattamento e dei gruppi di controllo

26. Utilizzare almeno quattro repliche per concentrazione di prova e almeno otto repliche per i controlli (e, se necessario, il controllo con solvente) (cioè il numero di repliche nel controllo e l'eventuale controllo con solvente devono essere il doppio del numero di repliche di ciascun gruppo di trattamento, al fine di garantire un'adeguata potenza statistica). Ciascuna replica deve contenere al massimo 20 animali. Il numero minimo di animali trattati dovrebbe essere di 15 (5 per il sottocampione allo stadio NF62 e 10 allo stadio giovanile). Tuttavia, si aggiungono altri animali a ciascuna replica per tener conto della possibile mortalità, mantenendo il numero critico di 15.

PROCEDURA

Sintesi della prova

27. La prova è avviata con embrioni appena deposti (stadio NF8-10) e prosegue fino allo sviluppo delle giovani rane. Gli animali sono esaminati quotidianamente per verificare la mortalità e qualsiasi segno di comportamento anomalo. Allo stadio NF62 un sottocampione di larve (fino a 5 animali per replica) è prelevato per esaminare vari endpoint (tabella 1). Dopo che tutti gli animali hanno raggiunto lo stadio NF66, vale a dire il completamento della metamorfosi (o dopo 70 giorni dall'inizio della prova, se precedente), è effettuata una selezione casuale (ma senza sottocampionamento) di animali

▼M8

che saranno eliminati per ridurne il numero (10 per vasca) (cfr. il paragrafo 43) e i restanti animali continuano ad essere esposti fino a 10 settimane dopo il tempo mediano fino allo stadio di NF62 nel controllo. Al completamento della prova (campionamento delle rane giovani) sono effettuate ulteriori misurazioni (tabella 1).

Condizioni di esposizione

28. Una sintesi completa dei parametri del metodo figura nell'appendice 3. Durante il periodo di esposizione, l'ossigeno disciolto, la temperatura e il pH delle soluzioni di prova sono misurati quotidianamente. La conduttività, l'alcalinità e la durezza sono misurate una volta al mese. Per la temperatura dell'acqua delle soluzioni di prova, i differenziali inter-repliche e inter-trattamenti (nell'arco di un giorno) non devono superare 1,0 °C. Analogamente, per il pH delle soluzioni di prova, i differenziali inter-repliche e inter-trattamenti non devono superare 0,5.

29. Le vasche di esposizione possono essere sifonate quotidianamente per rimuovere i resti di cibo non consumati e i prodotti di scarto, facendo attenzione ad evitare la contaminazione incrociata delle vasche. Si deve prestare la massima attenzione a ridurre al minimo lo stress e i traumi per gli animali, 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.

Durata dell'esposizione alla sostanza chimica in esame

30. L'esposizione è avviata con embrioni appena deposti (stadio NF8-10) e prosegue fino a dieci settimane dopo il tempo mediano dello stadio NF62 (≤ 45 giorni dall'inizio della prova) nel gruppo di controllo. In generale, la durata del LAGDA è di 16 settimane (massimo 17 settimane).

Avvio della prova

31. Sarà stato precedentemente dimostrato che gli animali riproduttori utilizzati per l'avvio della prova sono in grado di generare discendenti geneticamente sessuati (appendice 5). Dopo la deposizione delle uova degli adulti, gli embrioni sono raccolti, trattati con cisteina in modo da eliminare lo strato gelatinoso e sottoposti a controlli per verificarne la vitalità (23). Il trattamento con cisteina consente di manipolare gli embrioni durante lo screening senza che aderiscano alle superfici. Lo screening avviene mediante un microscopio a dissezione utilizzando un contagocce di misura adeguata per rimuovere gli embrioni non vitali. È preferibile utilizzare per la prova embrioni di un'unica deposizione che presenti una vitalità superiore al 70 %. Gli embrioni allo stadio NF8-10 sono ripartiti in modo casuale in vasche di trattamento contenenti un volume adeguato di acqua di diluizione, fino a che ciascuna vasca contenga 20 embrioni. Gli embrioni vanno manipolati con cura durante il trasferimento per ridurre al minimo lo stress ed evitare qualsiasi lesione. Dopo 96 ore dalla fecondazione, i girini devono aver risalito la colonna d'acqua e aver cominciato ad aderire alle pareti della vasca.

Regime alimentare

32. Il regime e la frequenza di alimentazione nei vari stadi di vita di *X. laevis* rappresentano un aspetto molto importante del protocollo LAGDA. Un'alimentazione eccessiva durante la fase larvale determina generalmente un aumento dei casi di scoliosi e della loro gravità (appendice 8) e deve essere pertanto evitata. Per contro, un'alimentazione inadeguata durante la fase larvale si traduce in ritmi di sviluppo estremamente variabili tra i controlli,

▼M8

con il rischio di compromettere la potenza statistico o i risultati della prova. L'appendice 4 illustra il regime alimentare raccomandato per le larve e le rane giovani di *X. laevis* in condizioni di flusso continuo, ma sono ammesse alternative purché gli organismi sperimentali crescano e si sviluppino in modo soddisfacente. Giova notare che se sono misurati gli effetti sul sistema endocrino, si devono utilizzare mangimi privi di sostanze attive sul sistema endocrino quali la farina di soia.

Alimentazione delle larve

33. La dieta raccomandata è costituita da mangimi per l'alimentazione delle trote, da dischi di alghe *Spirulina* e da fiocchi per pesci rossi (ad esempio fiocchi di TetraFin®, Tetra, Germania) mescolati in acqua di coltura (o di diluizione). Tale miscuglio è somministrato tre volte al giorno nei giorni infrasettimanali e una volta al giorno durante i fine settimana. I girini sono alimentati con naupli vivi (di 24 ore) di *Artemia*, due volte al giorno nei giorni infrasettimanali e una volta al giorno durante i weekend a partire dall'8 ° giorno dopo la fecondazione. L'alimentazione delle larve, che deve essere coerente in ciascuna vasca di prova, deve consentire crescita e sviluppo adeguati degli animali sperimentali, al fine di garantire la riproducibilità e la trasferibilità dei risultati della prova: 1) il tempo mediano fino allo stadio NF62 nel controllo deve essere di ≤ 45 giorni; e 2) è raccomandato un peso medio di 1,0 ± 0,2 g allo stadio NF62 nei controlli.

Alimentazione delle rane giovani

34. Una volta terminata la metamorfosi, il regime alimentare consiste di mangimi di prima scelta per gli anfibi di tipo 3/32 (Xenopus Express, FL, USA) (appendice 4). Per i ranocchi (rane al primo stadio giovanile), il granulato è macinato velocemente in un macinacaffè o in un mixer o schiacciato con pestello in un mortaio per ridurne le dimensioni. Quando le rane giovani sono diventate sufficientemente grandi da consumare il granulato intero, la macinazione o la triturazione non sono più necessarie. Gli animali vanno nutriti una volta al giorno. L'alimentazione delle rane giovani deve permettere una crescita e uno sviluppo adeguati degli organismi: al completamento della prova è raccomandato un peso medio di 11,5 ± 3 g per le rane giovani di controllo.

Analisi chimiche

35. Prima di avviare la prova occorre determinare la stabilità della sostanza in esame (ad esempio, solubilità, degradabilità e volatilità) e stabilire tutti i metodi analitici necessari, ad esempio utilizzando le informazioni o le conoscenze disponibili. Se l'amministrazione delle dosi avviene attraverso l'acqua di diluizione, si raccomanda di analizzare ciascuna soluzione di prova da ciascuna delle vasche di replica prima dell'inizio della prova per verificare le prestazioni del sistema. Durante il periodo di esposizione, le concentrazioni della sostanza chimica in esame sono determinate ad intervalli appropriati, preferibilmente ogni settimana per almeno una replica in ciascun gruppo di trattamento, con rotazione delle repliche dello stesso gruppo di trattamento ogni settimana. 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 ± 20 % della concentrazione nominale, i risultati possono essere calcolati a partire dai valori nominali o misurati. Inoltre, il coefficiente di variazione (CV) delle concentrazioni di prova misurate nel corso dell'intero periodo di prova in un trattamento deve essere mantenuto uguale o inferiore a 20 % in ciascuna concentrazione. Se le concentrazioni misurate non rientrano nell'80-120 % della concentrazione nominale (ad esempio, quando si testano sostanze fortemente biodegradabili o adsorbenti), occorre determinare le concentrazioni efficaci ed esprimerle in rapporto alla media aritmetica delle concentrazioni nelle prove a flusso continuo.

▼M8

36. Le velocità di flusso dell'acqua di diluizione e della soluzione madre sono controllate a intervalli appropriati (ad esempio tre volte alla settimana) per tutta la durata dell'esposizione. Nel caso di sostanze chimiche che non possono essere rilevate ad alcune o a tutte le concentrazioni nominali (ad esempio, a causa di una rapida degradazione o adsorbimento nelle vasche di prova, o di un marcato accumulo di sostanze chimiche negli organismi degli animali esposti), si raccomanda di adeguare il tasso di ricambio della soluzione di prova in ciascuna vasca al fine di mantenere il più possibile costanti le concentrazioni di prova.

Osservazioni e misurazioni degli endpoint

37. Gli endpoint valutati nel corso dell'esposizione sono quelli indicativi della tossicità, compresi mortalità, comportamenti anomali (ad es. segnali clinici di malattia e/o di tossicità generale) e indicatori di crescita (lunghezza e peso), nonché gli effetti patologici dovuti sia alla tossicità generale che ai meccanismi di azione endocrina che influiscono sui processi fisiologici mediati da estrogeni, androgeni o tiroide. Inoltre, la concentrazione di VTG nel plasma può essere misurata in via facoltativa al completamento della prova. La misurazione della VTG può essere utile per comprendere i risultati dello studio nel contesto dei meccanismi endocrini per i presunti interferenti endocrini. Gli endpoint misurati e la frequenza di misurazione sono riassunti nella tabella 1.

Tabella1

Panoramica degli endpoint del LAGDA

Endpoint (*)	Quotidiano	Campionamento intermedio (campioni di larve)	Conclusione della prova (campioni di esemplari giovani)
Mortalità e anomalie	X		
Tempo fino allo stadio NF62		X	
Isto(pato)logia (tiroide)		X	
Morfometria (crescita in peso e in lunghezza)		X	X
Indice epatosomatico (IES)			X
Rapporti numerici tra sessi genotipici/fenotipici			X
Istopatologia (gonadi, dotti riproduttivi, reni e fegato)			X
Vitellogenina (VTG) (facoltativo)			X

(*) Tutti gli endpoint sono analizzati statisticamente.

Mortalità e osservazioni giornaliere

38. Tutte le vasche sperimentali sono controllate quotidianamente per individuare animali morti e registrarne il numero per ciascuna vasca. Gli animali morti sono rimossi dalla vasca non appena individuati. Lo stadio di sviluppo degli animali morti va classificato come pre-stadio NF58 (che precede l'apparizione degli arti anteriori), tra gli stadi NF58 e NF62, tra gli stadi NF62 e NF63 (tra lo stadio NF62 e il completo assorbimento della coda) o stadio NF66 (post-larvale). I tassi di mortalità superiore al 20 % potrebbero indicare condizioni sperimentali inadeguate o effetti manifestamente tossici della sostanza chimica in esame. Gli animali tendono ad essere più sensibili a

▼M8

episodi di mortalità non dipendenti dalle sostanze chimiche durante i primi giorni di sviluppo che seguono la deposizione delle uova e durante il picco metamorfico. Tale mortalità può risultare dai dati relativi ai controlli.

39. Inoltre, qualsiasi osservazione di comportamenti anomali, malformazioni evidenti (ad esempio, scoliosi), o lesioni, deve essere annotata. Le osservazioni di scoliosi vanno contate (incidenza) e classificate in base alla gravità (ad esempio, non osservabile: NR, minima: 1, moderata: 2, grave 3; appendice 8). Sforzi devono essere compiuti per limitare la prevalenza di scoliosi moderate e gravi (ad esempio, inferiore al 10 % nei controlli) per tutta la durata dello studio, anche se una maggiore prevalenza di anomalie dei controlli non costituisce necessariamente un motivo per interrompere la prova. Si riscontra un comportamento normale quando le larve rimangono sospese 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. Per gli animali post-metamorfosi, oltre ai citati comportamenti anomali, vanno registrate le grandi differenze di consumo alimentare tra i gruppi trattati. Le malformazioni e le lesioni apparenti possono manifestarsi tra l'altro con anomalie morfologiche (ad esempio deformità dei membri), lesioni emorragiche, edema addominale e infezioni batteriche o micotiche. Le lesioni sulla testa nelle rane giovani, subito dietro le narici, possono essere indicative di livelli di umidità insufficienti. 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. Un tasso di tali anomalie superiore nelle vasche esposte rispetto al gruppo di controllo costituisce la prova di una tossicità evidente.

Sottocampione di larve

Descrizione generale della preparazione di sottocampioni di larve

40. I girini che hanno raggiunto lo stadio NF62 devono essere rimossi dalle vasche, campionati o spostati alla prossima fase dell'esposizione in una nuova vasca, oppure fisicamente separati dagli altri girini nella medesima vasca mediante un divisore. I girini sono controllati ogni giorno e viene annotato il giorno in cui ogni singolo girino raggiunge lo stadio NF62. La caratteristica distintiva nell'ambito di questa valutazione è la forma della testa. Quando la testa si è ridotta in misura tale da apparire approssimativamente della stessa larghezza del tronco del girino e gli arti anteriori hanno raggiunto il livello della metà del cuore, si considera che l'individuo ha raggiunto lo stadio NF62.

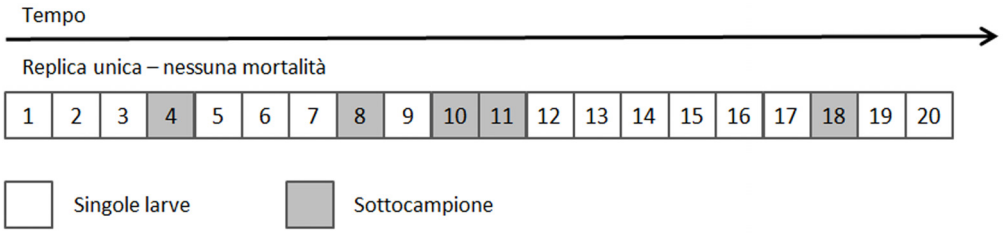
41. L'obiettivo è prelevare un campione di un totale di cinque girini allo stadio NF62 per vasca di replica. Il prelievo deve avvenire in modo assolutamente casuale, ma deve essere deciso precedentemente. La **figura 1** mostra un esempio ipotetico di vasca di replica. Se in una determinata vasca sopravvivono 20 girini quando il primo individuo raggiunge lo stadio NF62, sono selezionati cinque esemplari a caso tra 1 e 20. Il girino #1 è il primo individuo a raggiungere lo stadio NF62 e il girino #20 è l'ultimo individuo in una vasca a raggiungere lo stadio NF62. Analogamente, se vi sono 18 larve sopravvissute in una vasca, la selezione di 5 esemplari si farà a caso tra 1 e 18. La procedura va eseguita per ciascuna replica quando il prima individuo raggiunge lo stadio NF62. In caso di mortalità durante il campionamento dello stadio NF62, i campioni rimanenti devono essere nuovamente randomizzati in funzione di quante larve pre-stadio NF62 sono rimaste e di quanti altri campioni sono necessari per raggiungere un totale di cinque campioni da quella replica. Il giorno in cui un girino raggiunge lo stadio NF62, si consulta il diagramma di campionamento preparato per stabilire se

▼M8

tale individuo deve essere campionato o separato fisicamente dagli altri girini per continuare l'esposizione. Nell'esempio illustrato (figura 1), il primo individuo che ha raggiunto lo stadio NF62 (ad es. casella #1) è fisicamente separato dalle altre larve, prosegue l'esposizione e il giorno dello studio in cui tale esemplare raggiunge lo stadio NF62 viene annotato nella relazione. Successivamente, gli esemplari #2 e #3 sono sottoposti al medesimo trattamento del #1 e quindi l'esemplare #4 è prelevato per osservare gli indicatori di crescita e per procedere a un esame istologico della tiroide (secondo questo esempio). Questa procedura prosegue fino al momento in cui il 20 ° esemplare raggiunge gli altri esemplari che hanno superato lo stadio NF62 o è sottoposto a campionamento. La procedura random utilizzata deve garantire a tutti i girini la medesima probabilità di essere selezionati. Ciò può essere ottenuto con qualsiasi metodo di scelta casuale, ma richiede anche che ciascun girino sia stato catturato con un retino a un certo punto durante il periodo di sottocampionamento prima di raggiungere lo stadio NF62.

Figura 1

Esempio ipotetico di regime di campionamento allo stadio NF62 in una singola vasca di replica



42. Per il sottocampionamento larvale, gli endpoint ottenuti sono: 1) tempo fino allo stadio NF62 (ossia, numero di giorni tra la fecondazione e lo stadio NF62); 2) anomalie esterne; 3) morfometria (ad. es., peso e lunghezza); e 4) istologia della tiroide.

Soppressione incruenta dei girini

43. Il sottocampione di girini allo stadio NF62 (5 esemplari per replica) è soppresso immergendolo per 30 minuti in quantità appropriate (ad esempio 500 ml) di soluzione anestetica (ad esempio, soluzione a 0,3 % di MS-222, metan sulfonato di tricaina, CAS.886-86-2). La soluzione MS-222 deve essere tamponata con bicarbonato di sodio a un pH di circa 7,0, in quanto la soluzione MS-222 non tamponata è acida e irritante per la pelle della rana, causa di un limitato assorbimento e un'inutile stress supplementare per gli organismi.

44. Mediante retino, un girino è rimosso dalla vasca sperimentale e trasferito (immerso) nella soluzione anestetica. Dopo l'eliminazione incruenta eseguita correttamente, l'animale è pronto per l'autopsia quando non è più in grado di reagire agli stimoli esterni, come il pizzicamento dell'arto posteriore con un paio di pinze.

Morfometria (peso e lunghezza)

45. Le misurazioni del peso umido (al mg) e della lunghezza dall'apice del muso alla cloaca (SVL) (a 0,1 mm) di ciascun girino vanno effettuate immediatamente non appena il girino non risponde più agli stimoli sotto l'effetto dell'anestesia (figura 2a). Si può utilizzare un software di analisi delle

▼M8

immagini per misurare la SVL a partire da una fotografia. I girini devono essere asciugati per tamponamento prima di essere pesati in modo da rimuovere l'acqua in eccesso. Dopo la misurazione delle dimensioni del corpo (peso e SVL), si raccomanda di registrare o annotare qualsiasi alterazione morfologica grave e/o segni clinici di tossicità quali scoliosi (cfr. appendice 8), petecchie ed emorragie; si raccomanda di utilizzare uno strumento digitale per documentare le anomalie. La petecchia è una piccola emorragia puntiforme, di colore rosso o violaceo, dei capillari della pelle.

Raccolta e fissazione dei tessuti

46. Le ghiandole tiroidee del sottocampione di larve sono esaminate in vista dell'analisi istologica. La parte inferiore del torso situata dietro agli arti anteriori è rimossa ed eliminata. La carcassa dissezionata è fissata nel fissativo di Davidson. Il volume di fissativo nella vasca deve essere superiore o uguale a 10 volte il volume approssimativo dei tessuti. Il fissativo è agitato o fatto roteare in modo idoneo per fissare adeguatamente i tessuti in esame. Tutti i tessuti rimangono nel fissativo di Davidson per almeno 48 ore, ma non più di 96 ore; sono quindi sciacquati in acqua deionizzata e conservati in formalina al 10 % neutra tamponata (1) (29).

Istologia della tiroide

47. Ciascun sottocampione di larve (tessuti fissati) è sottoposto ad analisi istologica delle ghiandole della tiroide, al fine di effettuare una diagnosi e valutare l'indice di gravità (29) (30).

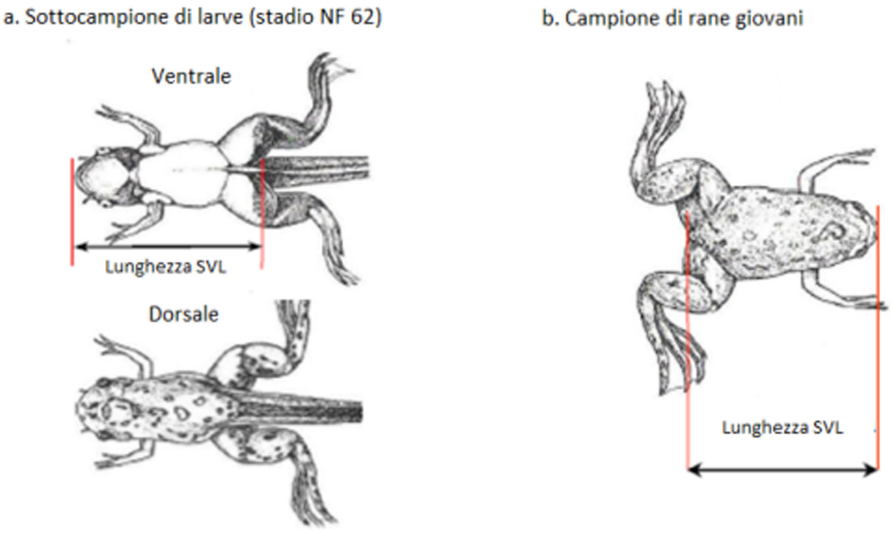


Figura 2: Parametri per la misurazione della lunghezza dall'apice del muso alla cloaca nel LAGDA nei girini allo stadio NF62 (a) e nelle rane giovani (b). Le caratteristiche distintive dello stadio NF62 (a): la testa ha la stessa larghezza del tronco, la lunghezza del nervo olfattivo è più corta del diametro del bulbo olfattivo (vista dorsale), e gli arti anteriori sono al livello del cuore (vista ventrale). Immagini adattate da Nieuwkoop e Faber (1994).

Fine dell'esposizione larvale

48. Dato il numero iniziale di girini, si prevede che vi sarà probabilmente una piccola percentuale di individui che non si sviluppano normalmente e non effettuano la metamorfosi (NF66) in un lasso di tempo ragionevole. La parte

▼M8

larvale dell'esposizione non deve superare i 70 giorni. I girini rimasti alla fine di questo periodo devono essere soppressi in modo non cruento (cfr. paragrafo 43); vanno misurati il peso umido e la SVL, lo stadio di sviluppo è stabilito secondo il metodo di Nieuwkoop e Faber, 1994, e le eventuali anomalie di sviluppo sono registrate.

Eliminazione dopo lo stadio NF66

49. Dieci individui per vasca sono conservati a partire dallo stadio NF66 (riassorbimento totale della coda) fino al completamento dell'esposizione. Pertanto, dopo che tutti gli animali hanno raggiunto lo stadio NF66 o 70 giorni (a seconda di quale condizione si verifica prima), è opportuno procedere alla loro eliminazione. Gli animali che hanno raggiunto lo stadio di sviluppo NF66, ma che non saranno conservati per continuare l'esposizione sono scelti a caso.

50. Gli animali non selezionati per continuare l'esposizione sono soppressi in modo incruento (cfr. paragrafo 43). Lo stadio di sviluppo, il peso umido e la SVL (figura 2b) sono misurati e ciascun animale è sottoposto a necroscopia macroscopica. Il sesso fenotipico (in base alla morfologia delle gonadi) è registrato come femmina, maschio o indeterminato.

Campioni di rane giovani

Descrizione generale della preparazione di campioni di rane giovani

51. Gli animali restanti continuano ad essere esposti fino a 10 settimane dopo il tempo mediano fino allo stadio NF66 nel controllo contenente l'acqua di diluizione (e/o del controllo con solvente, se del caso). Alla fine del periodo di esposizione, i rimanenti animali (massimo 10 rane per replica) sono soppressi in modo incruento e i vari endpoint sono misurati o valutati e registrati: 1) morfometria (peso e lunghezza); 2) rapporti numerici tra i sessi fenotipici/genotipici; 3) peso del fegato (indice epato-somatico); 4) esame istopatologico (gonadi, dotti riproduttivi, fegato e reni) e, facoltativamente, 5) VTG nel plasma.

Soppressione incruenta delle rane

52. I campioni di rane allo stadio giovanile (post-metamorfosi), sono soppressi con un'iniezione intraperitoneale di anestetico, ad esempio 10 % MS-222 in una idonea soluzione tamponata di fosfato. Le rane possono essere prelevate quando non reagiscono più agli stimoli (in genere circa 2 minuti dopo l'iniezione, se si usa il 10 % di MS-222 in un dosaggio di 0,01 ml per g di rana). Sebbene le rane allo stadio giovanile possano essere immerse in una concentrazione più elevata di anestetico (MS-222), l'esperienza ha dimostrato che questo metodo richiede più tempo e che tale durata può non essere adeguata per il campionamento. L'iniezione permette di sopprimere gli animali in modo incruento, efficiente e rapido prima del campionamento, che non deve essere avviato fino a quando non sia stata confermata la mancanza di reattività delle rane per assicurarsi che gli animali siano effettivamente morti. Se le rane presentano segni di manifesta sofferenza (cioè elevatissime sofferenze e probabile morte) o sono moribonde, gli animali devono essere anestetizzati e soppressi in modo incruento e trattati come casi di mortalità ai fini dell'analisi dei dati. Se una rana viene soppressa per morbilità, ciò viene annotato nella relazione sulla prova. A seconda del momento durante la prova in cui la rana è soppressa, l'animale può essere conservato per l'analisi istopatologica (mantenendolo in fissativo per un'eventuale esame istopatologico).

Morfometria (peso e lunghezza)

53. Le misurazioni del peso umido e della SVL (figura 2b) sono identiche a quelle descritte per il sottocampione di larve.

▼M8

VTG nel plasma (facoltativo)

54. La VTG è un biomarcatore comunemente accettato, derivante dall'esposizione a sostanze chimiche estrogeniche. Per il LAGDA, la VTG del plasma può essere facoltativamente misurata all'interno dei campioni di rane giovani (ciò può essere particolarmente rilevante se si sospetta che la sostanza chimica in esame sia un estrogeno).

55. Gli arti posteriori delle rane giovani soppresse sono sezionati e il sangue raccolto con un tubo capillare eparinato (anche se metodi alternativi di raccolta del sangue, come la puntura cardiaca, possono essere adatti). Il sangue è espulso in una provetta da microcentrifuga (ad esempio di 1,5 ml di volume) e centrifugato per ottenere il plasma. I campioni di plasma devono essere conservati a una temperatura pari o inferiore a -70 °C fino alla misurazione della VTG. La concentrazione di VTG nel plasma può essere misurata mediante una prova di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) (appendice 6) o un metodo alternativo, ad esempio la spettrometria di massa (31). Gli anticorpi specifici della specie sono preferibili a motivo della loro maggiore sensibilità.

Determinazione del sesso genetico

56. Il sesso genotipico di ogni rana giovane è valutato in base ai marcatori sviluppati da Yoshimoto *et al.* Per determinare il sesso genotipico, una porzione (o la totalità) di un arto posteriore (o di qualsiasi altro tessuto) è prelevato durante la dissezione e conservato in una provetta da microcentrifuga (i campioni di tessuto possono essere prelevati da qualsiasi tessuto). Il tessuto può essere conservato a una temperatura pari o inferiore a -20 °C fino all'isolamento dell'acido desossiribonucleico (DNA). L'isolamento del DNA da tessuti può essere effettuato con kit disponibili in commercio e la presenza o l'assenza del marcatore è analizzata con il metodo della reazione a catena della polimerasi (PCR) (appendice 5). In genere, la concordanza tra sesso istologico e genotipo negli animali di controllo al momento del campionamento delle rane allo stadio giovanile del gruppo di controllo è superiore al 95 %.

Raccolta e fissazione dei tessuti per l'istopatologia

57. Le gonadi, i dotti di riproduzione, i reni e i fegati sono raccolti per l'esame istologico durante il campionamento finale. La cavità addominale è aperta e il fegato dissezionato e pesato. Successivamente, gli organi digestivi (ad. es. stomaco, intestini) sono rimossi con cura dalla parte inferiore dell'addome per far apparire le gonadi, i reni e i dotti di riproduzione. Va presa nota di qualsiasi anomalia morfologica grossolana delle gonadi. Infine, sono rimossi gli arti posteriori se non sono già stati precedentemente rimossi per la raccolta del sangue. I fegati raccolti e la carcassa con le gonadi conservate *in situ* sono collocati immediatamente nel fissativo di Davidson. Il volume di fissativo nel contenitore deve essere superiore o uguale a 10 volte il volume approssimativo dei tessuti. Tutti i tessuti rimangono nel fissativo di Davidson per almeno 48 ore, ma non più di 96 ore; sono quindi sciacquati in acqua deionizzata e conservati in formalina al 10 % neutra tamponata (1) (29).

Esame istopatologico

58. Ciascun campione di rana giovane è sottoposto ad analisi istologica per individuare patologie nelle gonadi, nei dotti di riproduzione, nei reni e nei tessuti epatici (32). Anche il fenotipo delle gonadi è osservato in tale valutazione (ad esempio, ovaie, testicoli, ermafrodismo); insieme alla caratterizzazione del sesso genotipico di ciascun individuo, le osservazioni possono servire per calcolare rapporti numerici tra sessi fenotipici/genotipici.

▼M8

DATI E RELAZIONI

Analisi statistica

59. Il LAGDA genera tre tipologie di dati che vanno analizzati statisticamente: 1) dati quantitativi continui (peso, SVL, LSI, VTG); 2) dati relativi ai tempi che precedono le varie manifestazioni concernenti i ritmi di sviluppo (ad es., giorni fino al raggiungimento dello stadio NF62 a partire dall'avvio della prova); e 3) dati ordinali sotto forma di indici di gravità relativi o di stadi di sviluppo, derivanti dalle valutazioni istopatologiche.

60. Se si deve determinare la NOEC o la EC_x, si raccomanda che il disegno sperimentale e la prova statistica prescelta abbiano una potenza tale da consentire di individuare i cambiamenti d'importanza biologica negli endpoint. È preferibile effettuare le analisi statistiche dei dati (generalmente, sulla base della media delle repliche) seguendo le procedure descritte nel documento intitolato *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity data*: *A Guidance to Application* (33). L'appendice 7 del presente metodo di prova illustra l'albero delle decisioni raccomandato per l'analisi statistica e dà indicazioni per il trattamento dei dati e per la scelta del test o modello statistico più appropriato da utilizzare nel LAGDA.

61. I dati ottenuti dai campioni di rane giovani (ad esempio, crescita, LSI) sono analizzati separatamente per ciascun sesso genotipico, poiché il sesso genotipico è determinato per tutte le rane.

Considerazioni relative all'analisi dei dati

Utilizzo di repliche e di trattamenti compromessi

62. Repliche e trattamenti possono essere compromessi a causa della mortalità eccessiva dovuta a tossicità evidente, malattia o errore tecnico. Se un trattamento è compromesso da malattia o errore tecnico, tre trattamenti non compromessi e tre repliche non compromesse devono essere disponibili per l'analisi. Se una tossicità evidente si manifesta nel o nei trattamenti più forti, è preferibile che almeno tre livelli di trattamento con tre repliche non compromesse siano disponibili per l'analisi [conformemente all'approccio della concentrazione massima tollerata applicato nelle linee guida dell'OCSE per i metodi di prova (34)]. Oltre alla mortalità, i segni di tossicità manifesta possono includere effetti comportamentali (ad esempio animali galleggianti sulla superficie, che giacciono sul fondo della vasca, nuotano in modo irregolare o in direzione inversa, non salgono in superficie), lesioni morfologiche (ad esempio lesioni emorragiche, edema addominale) o inibizione delle reazioni alimentari normali se paragonate agli animali di controllo sotto il profilo qualitativo.

Controllo con solvente

63. Al completamento della prova, vanno valutati i potenziali effetti del solvente (se utilizzato), mediante un confronto statistico tra il gruppo di controllo con solvente e il gruppo di controllo con acqua di diluizione. I principali parametri da valutare in questo contesto sono gli indicatori di crescita (peso e lunghezza), poiché essi sono sensibili alla tossicità generale. Se tra i gruppi di controllo contenente acqua di diluizione e i gruppi di controllo con solvente vengono rilevate differenze statisticamente significative, si dovrebbe ricorrere al giudizio professionale di un esperto per stabilire se la validità della prova è compromessa. Se i due controlli differiscono, i controlli esposti alla sostanza chimica devono essere confrontati con il controllo con solvente, a meno che non sia noto che è preferibile effettuare il confronto con il controllo contenente acqua di diluizione. Se non vi sono differenze statisticamente significative tra i due gruppi di controllo, si raccomanda di confrontare i controlli esposti alla sostanza chimica in esame con i due gruppi di controllo (solvente e acqua di diluizione), a meno che non sia noto che è preferibile effettuare il confronto con il solo gruppo di controllo contenente l'acqua di diluizione o con il solo gruppo di controllo contenente il solvente.

▼M8

Relazione sulla prova

64. I seguenti dati devono figurare nella relazione sulla prova:

Sostanza chimica in esame

— natura fisica e, se del caso, proprietà fisicochimiche

— Sostanza monocostituente:

aspetto fisico, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;

identificazione chimica, come la denominazione IUPAC o CAS, il numero CAS, il codice SMILES o InChI, la formula strutturale, l'identità chimica o le impurezze, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc. (incluso il tenore di carbonio organico, se opportuno).

— Sostanza multicostituente, UVCB e miscele:

caratterizzata nella massima misura possibile mediante identità chimica (cfr. sopra), la presenza quantitativa e le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti.

Specie sperimentale:

— nome scientifico, ceppo, se disponibile, origine e metodo di raccolta delle uova fecondate e successiva manipolazione.

— Incidenza della scoliosi nei controlli storici della coltura madre utilizzata.

Condizioni sperimentali:

— fotoperiodo/i;

— disegno sperimentale (ad esempio, dimensioni della vasca di prova, materiale e volume d'acqua, numero di vasche di prova e repliche, numero di organismi di prova per replica);

— metodo di preparazione delle soluzioni madre e frequenza di rinnovo (indicare l'agente solubilizzante, se usato, e la sua concentrazione);

— metodo di dosaggio della sostanza chimica in esame (ad esempio pompe dosatrici, sistemi di diluizione);

— efficienza di recupero del metodo e concentrazioni nominali di prova, limite di quantificazione, medie dei valori misurati, rispettive deviazioni standard nelle vasche di prova, metodo con cui tali deviazioni e medie sono state ottenute così come dati comprovanti che le misurazioni corrispondono alle concentrazioni della sostanza chimica in esame in soluzione vera;

— caratteristiche dell'acqua di diluizione: pH, durezza, temperatura, concentrazione dell'ossigeno disciolto, livelli di cloro residuo (se misurati), iodio totale, carbonio organico totale (idem), solidi in sospensione (idem), salinità del mezzo di prova (idem) e altre eventuali misurazioni eseguite;

— concentrazioni nominali di prova, medie dei valori misurati e loro deviazioni standard;

— qualità dell'acqua nelle vasche sperimentali: pH, temperatura (giornaliera) e concentrazione di ossigeno disciolto;

▼M8

— informazioni dettagliate sul regime alimentare (ad esempio tipo di cibo, origine, quantità somministrata e frequenza).

Risultati:

— Dati comprovanti il fatto che i controlli hanno soddisfatto i criteri di validità;

— dati relativi al gruppo di controllo (più il controllo con solvente se utilizzato) e i gruppi trattati come segue: mortalità e anomalie osservate, tempo fino allo stadio NF62, esame istologico della tiroide (solo campione di larve), crescita (solo peso e lunghezza), LSI (solo campione di rane giovani), rapporti numerici tra i sessi fenotipici/genotipici (solo campione di rane giovani), risultati dell'esame istopatologico delle gonadi, dei dotti riproduttivi, dei reni e del fegato (solo campione di rane giovani) e la VTG nel plasma (se misurata, solo campione di rane giovani);

— approccio seguito per l'analisi statistica e per il trattamento dei dati (test o modello statistico utilizzato);

— concentrazione senza effetti osservati (NOEC) per ogni risposta valutata;

— concentrazione minima alla quale si osserva un effetto (LOEC) per ogni risposta valutata (a $\alpha = 0{,}05$); EC_x per ogni risposta valutata, se del caso, e intervalli di confidenza (95 %, ad esempio), grafico del modello adattato utilizzato per calcolarla, pendenza della curva concentrazione-risposta, formula del modello di regressione, stima dei parametri del modello e dei rispettivi errori standard.

— Eventuali deviazioni dal metodo di prova e dai criteri di accettazione e considerazioni relative alle potenziali conseguenze sui risultati della prova.

65. Per i risultati delle misurazioni degli endpoint, vanno presentati i valori medi e le rispettive deviazioni standard (se possibile, per replica e per concentrazione).

66. Il tempo mediano verso lo stadio NF62 nei controlli è calcolato e presentato come media delle mediane delle repliche e della loro deviazione standard. Analogamente, per i trattamenti è necessario calcolare una mediana del trattamento presentandola come media delle mediane delle repliche e della loro deviazione standard.

BIBLIOGRAFIA

(1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.

(2) OECD (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.

(4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1 130: 16-27.

▼**M8**

(5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140-144.

(6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1 565.

(7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.

(8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.

(9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.

(10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.

(11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2 469-2 474.

(12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

(13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441-448.

(14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.

(15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.

(16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.

(17) Capitolo C.4 del presente allegato, Determinazione della pronta biodegradabilità.

(18) Capitolo C.29 del presente allegato, Pronta biodegradabilità — CO_2 in recipienti ermetici.

(19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.

▼**M8**

(20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.

(21) OECD (2000). OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69-92.

(23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.

(24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.

(25) Capitolo C.38 del presente allegato, Prova sulla metamorfosi degli anfibi.

(26) Capitolo C.48 del presente allegato, Saggio di tossicità a breve termine sulla riproduzione di pesci.

(27) Capitolo C.41 del presente allegato, Prova sullo sviluppo sessuale dei pesci.

(28) Capitolo C.49 del presente allegato — Prova di tossicità acuta sugli embrioni di pesci.

(29) OECD (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.

(31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.

(32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(33) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

(34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

▼**M8**

Appendice 1

DEFINIZIONI

Endpoint apicale: indicatore di effetti a livello della popolazione.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

ELISA: (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) prova di immunoassorbimento enzimatico

EC_x: (concentrazione con effetto dell'x %) la concentrazione che provoca un effetto nell'x % degli organismi di prova durante un determinato periodo di esposizione rispetto al controllo. Ad esempio, EC_{50} è la concentrazione che si ritiene produca un effetto su un endpoint in esame nel 50 % della popolazione esposta durante il periodo di esposizione definito.

dpf: (*days post fertilization*) giorni dopo la fecondazione.

Prova a flusso continuo: prova nella quale le soluzioni testate scorrono nel sistema sperimentale con un flusso continuo durante il periodo di esposizione.

HPG (*Hypothalamic-pituitary-gonadal*) Axis: asse ipotalamo-ipofisi-gonadi

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry* — Unione internazionale di chimica pura e applicata.

Concentrazione minima alla quale si osserva un effetto (LOEC — *Lowest Observed Effect Concentration*): concentrazione più bassa testata della sostanza chimica in esame alla quale si osserva un effetto significativo ($p < 0,05$) rispetto al controllo. 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). L'appendice 7 fornisce orientamenti al riguardo.

Concentrazione letale mediana (LC_{50}): concentrazione della sostanza chimica in esame ritenuta letale per il 50 % degli organismi esposti nell'arco temporale della prova.

Concentrazione senza effetti osservati (NOEC): concentrazione di prova immediatamente inferiore alla LOEC, alla quale non vengono osservati effetti statisticamente significativi ($p < 0,05$) rispetto al controllo durante il periodo di esposizione definito.

SMILES: *Simplified Molecular Input Line Entry Specification* (notazione semplificata lineare delle molecole).

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

UVCB: sostanze la cui composizione non è conosciuta o è variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali origine biologica.

VTG: la vitellogenina è una lipo-glico-fosfo-proteina precursore delle proteine del tuorlo normalmente prodotta dalle femmine sessualmente attive di tutte le specie ovipare.

▼**M8**

Appendice 2

ALCUNE CARATTERISTICHE CHIMICHE DI UN'ACQUA DI DILUIZIONE DI QUALITÀ ACCETTABILE

Sostanza	Concentrazione limite
Particolato	5 mg/l
Carbonio organico totale	2 mg/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
Alluminio	1 µg/l
Arsenico	1 µg/l
Cromo	1 µg/l
Cobalto	1 µg/l
Rame	1 µg/l
Ferro	1 µg/l
piombo	1 µg/l
Nichel	1 µg/l
Zinco	1 µg/l
Cadmio	100 ng/l
Mercurio	100 ng/l
Argento	100 ng/l

▼**M8**

Appendice 3

CONDIZIONI SPERIMENTALI PER IL LAGDA

1. Specie sperimentale	*Xenopus laevis*
2. Tipo di prova	Flusso continuo
3. Temperatura dell'acqua	La temperatura nominale è di 21 °C. La temperatura media durante la prova è di 21 ± 1 °C (i differenziali inter-repliche e inter-trattamenti non devono superare 1,0 °C)
4. Qualità dell'illuminazione	Lampade fluorescenti (ad ampio spettro) 600-2000 lux (lumen/m^2) sulla superficie dell'acqua
5. Fotoperiodo	12 ore di luce, 12 ore di buio
6. Volume della soluzione di prova e vasca di prova (vasca)	4-10 l (profondità minima dell'acqua 10-15 cm) Vasca di vetro o di acciaio inossidabile
7. Rinnovo delle soluzioni di prova, in volume	Costante, in considerazione sia del mantenimento delle condizioni biologiche che dell'esposizione chimica (ad esempio, rinnovo del volume di 5 vasche al giorno)
8. Età degli organismi sperimentali all'avvio della prova	Stadio 8-10 secondo Nieuwkoop e Faber (NF)
9. Numero di organismi per replica	20 animali (embrioni)/ vasca (replica) all'inizio dell'esposizione e 10 animali (rane allo stadio giovanile)/ vasca (replica) dopo lo stadio NF66 fino al completamento dell'esposizione
10. Numero di trattamenti	Minimo 4 trattamenti per la sostanza chimica in esame più controlli appropriati
11. Numero di repliche per trattamento	4 repliche per trattamento per la sostanza chimica in esame e 8 repliche per il o i controlli
12. Numero di organismi per concentrazione di prova	Minimo 80 animali per trattamento per la sostanza chimica in esame e minimo 160 animali per il o i controlli
13. Acqua di diluizione	Qualsiasi acqua che consenta la crescita e lo sviluppo normali di *X. laevis* (ad esempio, acqua di sorgente o acqua di rubinetto filtrata con carbone)
14. Aerazione	Non è obbligatoria, ma l'aerazione delle vasche può essere necessaria se i livelli di ossigeno disciolto scendono al di sotto dei limiti raccomandati e se il flusso della soluzione di prova è portato al massimo.
15. Ossigeno disciolto della soluzione di prova	Ossigeno disciolto: ≥ 40 % del valore di saturazione dell'aria o ≥ 3,5 mg/l

▼**M8**

16.	pH della soluzione di prova	6.5-8.5 (i differenziali inter-replica e inter-trattamenti non devono superare 0,5).
17.	Durezza e alcalinità della soluzione di prova	10-250 mg $CaCO_3$/l
18.	Regime alimentare	(Cfr. appendice 4).
19.	Periodo d'esposizione	Dallo stadio NF8-10 fino a dieci settimane dopo il tempo mediano verso lo stadio NF62 nel gruppo di controllo contenente l'acqua di diluizione e/o il solvente (massimo 17 settimane)
20.	Endpoint biologici	Mortalità (e anomalie morfologiche), tempo verso lo stadio NF62 (campione di larve), istologia della tiroide (campione di larve), crescita (peso e lunghezza), indice epatico-somatico (campione di rane giovani), rapporti numerici tra i sessi genotipici/fenotipici (campione di rane giovani), istopatologia delle gonadi, dei dotti di riproduzione, dei reni e del fegato (campione di rane giovani) e della vitellogenina nel plasma (campione di rane giovani) (facoltativo).
21.	Criteri di validità della prova	L'ossigeno disciolto è > 40 % del valore di saturazione dell'aria; la temperatura media dell'acqua si situa nell'intervallo di 21 ± 1 ^{o}C e i differenziali inter-repliche e inter-trattamenti sono < 1,0 ^{o}C; il pH della soluzione di prova è compreso tra 6,5 e 8,5; la mortalità nei controlli è ≤ 20 % in ciascuna replica e il tempo medio verso lo stadio NF62 nel controllo è ≤ 45 giorni; il peso medio degli organismi di prova nello stadio NF62 e al completamento della prova nei controlli e nei controlli con solvente (se utilizzati) raggiunge rispettivamente 1,0 ± 0,2 e 11,5 ± 3 g.; 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.

▼M8

Appendice 4

Regime Alimentare

Giova osservare che, sebbene il presente regime alimentare sia raccomandato, si possono prevedere alternative a condizione che gli organismi di prova crescano e si sviluppino a un ritmo adeguato.

Alimentazione delle larve

Preparazione del mangime da somministrare alle larve

A. 1:1 (v/v) Trout Starter: algae/TetraFin® (o equivalente);

1. Trout Starter: miscelare 50 g di Trout Starter (granuli fini o polvere) e 300 ml di acqua filtrata adeguata in un miscelatore ad alta velocità per 20 secondi

2. miscela Algae/TetraFin® (o equivalente): miscelare 12 g di dischi di spirulina con 500 ml di acqua filtrata in un miscelatore ad alta velocità per 40 secondi, miscelare 12 g di Tedrain® (o equivalente) con 500 ml di acqua filtrata e poi mescolare il tutto fino ad ottenere 1 l di 12 g/l di dischi di spirulina con 12 g/litro di Tetrafin® (o equivalente).

3. Mescolare uguali volumi della miscela di Trout Starter e della miscela di alghe/TetraFin ® (o equivalente)

B. Artemie:

Far schiudere 15 ml di uova di artemia in 1 l di acqua salata (preparato aggiungendo 20 ml di NaCl a 1 l di acqua deionizzata). Dopo aver aerato per 24 ore a temperatura ambiente a luce costante, si procede alla raccolta delle artemie. In sintesi, l'arresto dell'aerazione permette alle artemie di depositarsi in 30 min. Le cisti che galleggiano sulla superficie della vasca sono ritirate e eliminate, quindi le artemie sono filtrate adeguatamente e immerse in 30 ml di acqua filtrata.

Protocollo di alimentazione

La tabella 1 contiene un riferimento al tipo e alla quantità di mangime somministrato alle larve durante l'esposizione. Gli animali devono essere alimentati tre volte al giorno dal lunedì al venerdì e una volta al giorno durante il fine settimana.

Tabella 1

Regime alimentare per le larve di *X. laevis* nelle condizioni di flusso continuo

Tempo (*) (post fecondazione)	Trout Starter: algae/TetraFin® (o equivalente)		Artemie	
	Giorno infrasettimanale (3 volte al giorno)	Weekend (1 volta al giorno)	Giorno infrasettimanale (2 volte al giorno)	Weekend (1 volta al giorno)
Giorni 4-14 (nelle settimane 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (nei giorni 8-15) 1 ml (dal giorno 16)	0,5 ml (nei giorni 8-15) 1 ml (dal giorno 16)
Settimana 2	0,67 ml	2,4 ml		
Settimana 3	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Settimana 4	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
Settimana 5	1,6 ml	4,4 ml	1 ml	1 ml

▼M8

Tempo (*) (post fecondazione)	Trout Starter: algae/TetraFin® (o equivalente)		Artemie	
	Giorno infrasettimanale (3 volte al giorno)	Weekend (1 volta al giorno)	Giorno infrasettimanale (2 volte al giorno)	Weekend (1 volta al giorno)
Settimana 6	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Settimana 7	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
Settimane 8-10	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

(*) Il giorno 0 corrisponde al giorno dell'iniezione di hCG.

Variazione di regime alimentare tra lo stadio larvale e lo stadio giovanile

Quando hanno completato la metamorfosi, le larve transitano verso il regime alimentare per le rane giovani, descritto di seguito. Durante tale transizione, le razioni alimentari somministrate alle larve sono ridotte proporzionalmente all'incremento delle razioni somministrate alle rane giovani in ciascun gruppo di cinque girini che hanno superato lo stadio NF62 e si avvicinano al completamento della metamorfosi (stadio NF66).

Alimentazione delle rane giovani

Regime alimentare degli esemplari allo stadio giovanile

Una volta completata la metamorfosi (stadio NF66), il regime di alimentazione cambia: sono somministrati solo mangimi di prima scelta di tipo 3/32 pollici (Xenopus Express™, FL, USA), o equivalenti.

Preparazione di granulati per la transizione dallo stadio larvale a quello giovanile

Il mangime in granuli per anfibi è macinato brevemente in un macinacaffè, in un mixer o con mortaio e pestello, in modo da ridurre la dimensione dei granuli di circa 1/3. Si sconsiglia una macinazione troppo lunga, che trasformerebbe il granulato in polvere.

Protocollo alimentare

La **tabella 2** contiene un riferimento al tipo e alla quantità di mangime somministrato durante lo stadio giovanile e lo stadio adulto. Gli animali vanno nutriti una volta al giorno. Si noti che, nel corso della metamorfosi, gli animali continuano a ricevere una razione di artemidi fino a che > 95 % degli animali hanno completato la metamorfosi.

Gli animali non devono essere nutriti il giorno del completamento della prova in modo da non falsare il risultato delle misurazioni del peso.

Tabella 2

Regime alimentare per le rane giovani di *X. laevis* nelle condizioni di flusso continuo. Si noti che gli animali non metamorfizzati, compresi quelli la cui metamorfosi è stata ritardata dal trattamento chimico, non possono mangiare granuli non macinati

Tempo (*) (Settimane che seguono la data mediana della metamorfosi)	Mangime macinato (mg per ranocchietto)	Mangime intero (mg per ranocchietto)
Durante la metamorfosi degli animali	25	0
Settimane 0-1	25	28

▼**M8**

Tempo (*) (Settimane che seguono la data mediana della metamorfosi)	Mangime macinato (mg per ranocchietto)	Mangime intero (mg per ranocchietto)
Settimane 2-3	0	110
Settimane 4-5	0	165
Settimane 6-9	0	220

(*) Il primo giorno della settimana 0 corrisponde alla data mediana di metamorfosi degli animali di controllo.

▼M8

Appendice 5

DETERMINAZIONE DEL SESSO GENOTIPICO

Il metodo di determinazione del sesso genotipico nella specie *Xenopus laevis* si basa su Yoshimoto *et al.*, 2008. Le procedure dettagliate di genotipizzazione possono essere ottenute da tale pubblicazione, se necessario. Si possono utilizzare metodi alternativi (ad esempio PCR quantitativa in modalità *high-throughput*).

Primer di *X. laevis*

Marcatore DM-W

Senso: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Antisenso: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Controllo positivo

Senso: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Antisenso: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

Purificazione del DNA

Purificare il DNA dal tessuto muscolare o cutaneo, usando ad esempio il Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (cat # 69 506) o prodotto simile secondo le istruzioni del kit. Il DNA può essere eluito mediante colonnine da centrifuga utilizzando meno tampone per ottenere campioni più concentrati, se ritenuto necessario per la PCR. Si noti che il DNA è piuttosto stabile, pertanto si deve fare attenzione ad evitare contaminazioni incrociate che potrebbero causare un'erronea caratterizzazione di maschi come femmine, o viceversa.

PCR

Nella tabella 1 è riportato un protocollo di campionamento con il metodo JumpStart™ *Taq* di Sigma.

Tabella 1

Protocollo di campionamento con il metodo JumpStart™ *Taq* di Sigma

Master Mix	1x (µl)	[finale]
NFW (*)	11	-
Tampone 10x	2,0	-
$MgCl_2$ (25 mM)	2,0	2,5 mM
dNTP (10 mM ciascuno)	0,4	200 µM
Marcatore per il primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Marcatore per il primer antisenso (8 µM)	0,8	0,3 µM
Controllo per il primer (8 µM)	0,8	0,3 µM
Controllo per il primer antisenso (8 µM)	0,8	0,3 µM
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 unità/µl
Matrice di DNA	1,0	~200 pg/µl

(*) Nuclease-free water (acqua priva di nucleasi)
Nota: Al momento della preparazione del Master Mix, preparare una quantità di miscela supplementare per tener conto di eventuali perdite durante il pipettaggio (ad esempio: utilizzare 25x solo per 24 reazioni).

▼**M8**

Reazione:

Master Mix	19.0 µl
Modello	1.0 µl
Totale	20.0 µl

Profilo del termociclatore:

Fase 1.	94 °C	1 min
Fase 2.	94 °C	30 secondi
Fase 3.	60 °C	30 secondi
Fase 4.	72 °C	1 min
Fase 5.	Passare alla fase 2.	35 cicli
Fase 6.	72 °C	1 min
Fase 7.	mantenere a 4 °C.	

I prodotti della PCR possono essere collocati immediatamente in gel o conservati a 4 °C.

Elettroforesi su gel di agarosio (3 %) (protocollo per il campione)

50X TAE

Tris	24,2 g
Acido acetico glaciale	5,71 ml
Na_2 (EDTA)·$2H_2O$	3,72 g

Aggiungere acqua fino a 100 ml

1X TAE

H_2O	392 ml
50X TAE	8 ml

3:1 Agarosio

3 parti di agarosio NuSieve™ GTG™

1 parte di agarosio di Fisher a debole elettroendosmosi (EEO)

Metodo

1. Preparare un gel al 3 % aggiungendo 1,2 g di miscela d'agarosio a 43 ml di TAE 1X. Agitare fino a disgregare le agglutinazioni.

2. Scaldare la miscela di agarosio al microonde fino a dissoluzione completa (evitando il punto di ebollizione). Lasciar raffreddare leggermente.

3. Aggiungere 1,0 µl di bromuro di etidio (10 mg/ml). Agitare il flacone. Si noti che il bromuro di etidio è mutageno, pertanto è possibile utilizzare sostanze chimiche alternative, nella misura in cui ciò sia tecnicamente possibile, per ridurre al minimo i rischi per la salute dei lavoratori ([1]).

4. Colare il gel nello stampo con il pettine. Raffreddare completamente.

([1]) A norma dell'articolo 4, paragrafo 1, della direttiva 2004/37/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, sulla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti cancerogeni o mutageni durante il lavoro (sesta direttiva particolare ai sensi dell'articolo 16, paragrafo 1, della direttiva 89/391/CEE del Consiglio) (GU L 158 del 30.4.2004, pag. 50).

▼**M8**

5. Aggiungere il gel all'apparecchiatura. Ricoprire il gel di TAE 1X.

6. Aggiungere 1 µl di 6x colorante di dissociazione a ciascun volume di 10 µl di prodotto PCR.

7. Trasferire mediante pipetta i campioni nei pozzetti.

8. Effettuare l'elettroforesi a 160 volt costanti per ~ 20 minuti.

   La figura 1 presenta un'immagine di gel di agarosio che mostra i profili di bande indicativi di un individuo di sesso maschile e uno di sesso femminile.

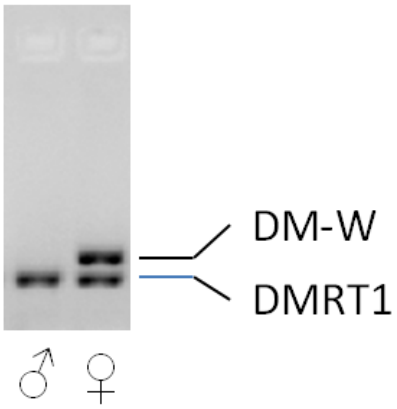


Figura 1: Immagine in gel di agarosio che mostra il profilo di banda indicativo di un individuo di sesso maschile (♂) (una banda a ~203 bp: DMRT1) e di un individuo di sesso femminile (♀) (due bande a ~259 bp: DM-W e 203 bp:DMRT1).

BIBLIOGRAFIA

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2 469-2 474.

▼M8

Appendice 6

Misurazione Della Vitellogenina

La misurazione della vitellogenina (VTG) è effettuata mediante una prova di immunoassorbimento enzimatico (ELISA), originariamente elaborato per la VTG dei ciprinidi (Parks *et al.*, 1999). Attualmente non esistono anticorpi in commercio per *X. laevis*. Tuttavia, data l'abbondanza di informazioni relative a questa proteina e la disponibilità di servizi commerciali di produzione di anticorpi con un buon rapporto costo/qualità, è ragionevole supporre che i laboratori possano sviluppare facilmente un test ELISA per effettuare questa misurazione (Olmstead *et al.*, 2009). Anche Olmstead *et al.* (2009) forniscono una descrizione della prova, modificata per la VTG di *X. tropicalis*, come indicato di seguito. Il metodo utilizza un anticorpo prodotto in reazione alla VTG di *X. tropicalis*, ma è noto che esso funziona anche per la VTG della specie *X. laevis*. Giova osservare che possono essere utilizzati anche test ELISA non competitivi e che questi possono avere limiti di rilevamento inferiori rispetto al metodo descritto di seguito.

Materiali e reagenti

— Siero contenente l'anticorpo primario preassorbito

— Mescolare 1 parte di siero contenente l'anticorpo primario anti-VTG della *X. tropicalis* con 2 parti di plasma di maschio prelevato dal gruppo di controllo e lasciar riposare a temperatura ambiente per ~ 75 minuti, porre in ghiaccio per 30 min, centrifugare a > 20K x G per 1 ora a 4 ^{o}C, eliminare il supernatante, aliquotare, conservare a -20 ^{o}C.

— Anticorpo secondario

— Coniugato IgG di capra anti-coniglio / HRP (ad es., Bio-Rad 172 -1019)

— Standard di VTG

— VTG purificata di *X. laevis* a 3,3 mg/ml.

— TMB (3,3', 5,5' tetrametil benzidina) (ad es., KPL 50-76-00; o Sigma T0440)

— Siero di capra (NGS)(e.g., Chemicon® S26-100ml)

— piastre da microtitolazione a 96 pozzetti in polistirene EIA (ad es., ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher:07-200-35)

— Forno di ibridazione a 37 ^{o}C (o incubatore ad aria a rapido riequilibrio) per piastre, bagnomaria per provette

— Altre attrezzature, sostanze chimiche e materiali comunemente utilizzati in laboratorio.

Ricette

Tampone di rivestimento (50 mM di tampone carbonato, pH 9.6):

$NaHCO_3$	1,26 g
Na_2CO_3	0,68 g
Acqua	428 ml

PBS 10X (0,1 M di fosfato, 1,5 M di NaCl):

$NaH_2PO_4.H_2O$	0,83 g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	20,1 g
NaCl	71 g
Acqua	810 ml

▼**M8**

Tampone di lavaggio (PBST):

PBS 10X	100 ml
Acqua	900 ml

Regolare il pH a 7,3 con 1 M di HCl, poi aggiungere 0,5 ml di Tween-20

Tampone di prova:

Siero di capra (NGS)	3,75 ml
Tampone di lavaggio:	146,25 ml

Prelievo dei campioni

Il sangue è raccolto mediante un tubo capillare per ematocrito eparinato e riposto nel ghiaccio. Dopo centrifugazione per 3 minuti, il tubo è etichettato, aperto e il plasma espulso in provette da microcentrifuga da 0,6 ml contenenti 0,13 unità di aprotinina liofilizzata. (Queste provette sono preparate in anticipo mediante aggiunta della quantità adeguata di aprotinina, congelamento e liofilizzazione in una centrifuga sotto vuoto a bassa temperatura fino ad essiccamento). Conservare il plasma a -80 °C fino all'analisi.

Procedura per una piastra

Rivestimento della piastra

Mescolare 20 µl di VTG purificata con 22 ml di tampone carbonato (3 µg/ml). Versare 200 µl della miscela in ciascun pozzetto di una piastra a 96 pozzetti. Ricoprire la piastra con pellicola sigillante adesiva e lasciar incubare a temperatura di 37 °C per 2 ore (o 4 °C per una notte).

Bloccare la piastra

La soluzione bloccante è preparata aggiungendo 2 ml di siero di capra (NGS) a 38 ml di tampone carbonato. Rimuovere la soluzione bloccante e asciugare agitando. Aggiungere 350 µl di soluzione bloccante in ciascun pozzetto. Ricoprire con pellicola sigillante adesiva e incubare a temperatura di 37 °C per 2 ore (o 4 °C per una notte).

Preparazione degli standard

Mescolare 5,8 µl di standard di VTG purificata con 1,5 ml di tampone di prova in una provetta di vetro monouso borosilicato (12 x 75 mm). Ciò consente di ottenere 12 760 ng/ml di soluzione. Preparare quindi una diluizione in serie aggiungendo 750 µl della diluizione precedente a 750 µl del tampone di prova per ottenere le concentrazioni finali di 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 e 50 ng/ml.

Preparazione dei campioni

Iniziare con una diluizione 1:300 (ad esempio, mescolare 1 µl di plasma con 299 µl di tampone di prova) o una diluizione 1:30 del plasma nel tampone di prova. Se si vogliono ottenere grandi quantità di VTG, possono essere necessarie diluizioni aggiuntive o maggiori. Cercare di mantenere il valore B/B_o entro l'intervallo degli standard. Per i campioni senza VTG apprezzabile, ad esempio maschi e femmine di controllo (che sono tutti immaturi), utilizzare la diluizione 1:30. I campioni meno diluiti possono indurre effetti di matrice indesiderati.

Si raccomanda inoltre di analizzare un campione di controllo positivo su ciascuna piastra. Tale controllo proviene da un pool di plasma contenente elevati livelli indotti di VTG. Il pool è inizialmente diluito in NGS, suddiviso in aliquote e conservato a -80 °C. Per ciascuna piastra, viene scongelata un'aliquota, ulteriormente diluita in tampone di prova ed analizzata come un campione di prova.

▼M8

Incubazione con l'anticorpo primario

Preparare l'anticorpo primario diluendo 1:2000 del siero contenente l'anticorpo primario preassorbito nel tampone di prova (ad esempio, 8 µl - 16 ml di tampone di prova). Combinare 300 µl di soluzione contenente l'anticorpo primario con 300 µl di campione/standard in una provetta di vetro. Preparare la provetta di B_o seguendo la medesima procedura con 300 µl di tampone di prova e 300 µl di anticorpo. Inoltre, preparare una provetta NSB contenente unicamente 600 µl di tampone di prova (cioè senza anticorpi). Ricoprire le provette con Parafilm e agitare delicatamente nell'agitatore. Mantenere in incubazione a 37 °C in bagnomaria per 1 ora.

Lavaggio della piastra

Lavare la piastra appena prima del completamento dell'incubazione dell'anticorpo primario. A tal fine, scuotere la piastra per farne uscire il contenuto e asciugarla con carta assorbente. Poi riempire i pozzetti con 350 µl di soluzione di lavaggio, svuotare e asciugare tamponando. In questo caso sono utili una pipetta a ripetizione multicanale o un lavatore per micropiastre. La fase di lavaggio è ripetuta altre due volte per un totale di tre lavaggi.

Caricamento della piastra

Una volta lavata la piastra, estrarre le provette dal bagnomaria e agitare leggermente nell'agitatore. Aggiungere 200 µl da ciascuna provetta di campione, di standard, di B_o e di NSB per raddoppiare i pozzetti della piastra. Ricoprire la piastra con pellicola sigillante adesiva e lasciar incubare a temperatura di 37 °C per 1 ora.

Incubazione con l'anticorpo secondario

Al termine dell'incubazione della fase precedente, le piastre vanno nuovamente lavate tre volte, come sopra indicato. Preparare l'anticorpo secondario diluito mescolando 2,5 µl dell'anticorpo secondario con 50 ml di tampone di prova. Aggiungere 200 µl dell'anticorpo secondario diluito in ciascun pozzetto, sigillare come sopra indicato, e incubare per 1 ora alla temperatura di 37 °C.

Aggiunta di un substrato

Quando l'incubazione dell'anticorpo secondario è completata, lavare la piastra tre volte come descritto in precedenza. Successivamente, aggiungere 100 µl di substrato TMB in ciascun pozzetto. Lasciar reagire per 10 minuti, preferibilmente al riparo da fonti di luce brillante. Arrestare la reazione aggiungendo 100 µl di acido fosforico 1 M. Ciò modificherà il colore da blu a giallo intenso. Misurare l'assorbanza a 450 nm utilizzando un lettore di micropiastre.

Calcolare B/B_0

Sottrarre il valore medio NSB da tutte le misurazioni; il valore B/B_0 di ciascun campione e standard è calcolato dividendo il valore di assorbanza (B) per l'assorbanza media del campione B_0.

Generare una curva standard e determinare le quantità sconosciute

Generare una curva standard con l'ausilio di un software di grafica (ad esempio Slidewrite™ o Sigma Plot ®) che estrapolerà la quantità dalla B/B_0 del campione sulla base della B/B_0 delle soluzioni standard. Tipicamente, la quantità è rappresentata su una scala logaritmica e la curva è di forma sigmoide, che, tuttavia, può apparire lineare quando l'intervallo di standard utilizzato è ristretto. Correggere le quantità del campione per il fattore di diluizione e annotare in mg di VTG/ml di plasma.

Determinare i limiti minimi di rilevazione

Spesso, soprattutto negli esemplari maschi normali, non sarà chiaro come annotare i risultati ottenuti dai valori bassi. In questi casi, si utilizza un intervallo di confidenza al 95 % per determinare se il valore debba essere indicato come "zero" o un altro numero. Se il risultato del campione corrisponde all'intervallo

▼M8

di confidenza dello standard zero (B_0), il risultato deve essere registrato come zero. Il livello minimo di rilevazione sarà il livello più basso che è sistematicamente diverso dallo standard zero; ciò significa che i due intervalli di confidenza non si sovrappongono. Se il risultato di campionamento si situa all'interno o al di sopra del limite di confidenza del livello minimo di rilevazione, si registrerà il valore calcolato. Se un campione è compreso tra lo standard zero e gli intervalli di confidenza del limite minimo di rilevazione, si annota una metà del livello minimo di rilevazione per il valore di tale campione.

BIBLIOGRAFIA

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113-125.

▼M8

Appendice 7

Analisi Statistica

Il LAGDA genera tre tipologie di dati che vanno analizzati statisticamente: 1) dati quantitativi continui; 2) dati relativi ai tempi che precedono le varie manifestazioni concernenti i ritmi di sviluppo (giorni fino al raggiungimento dello stadio NF62); e 3) dati ordinali sotto forma di indici di gravità relativi o di stadi di sviluppo, derivanti da valutazioni istopatologiche. L'albero decisionale raccomandato per l'analisi statistica per il LAGDA è illustrato nella figura 1. Di seguito sono riportate anche alcune annotazioni che potrebbero essere utili per effettuare tale analisi. Con riferimento all'albero decisionale, i valori ottenuti per la mortalità, la crescita (peso e lunghezza) e l'indice epatosomatico (LSI) devono essere analizzati conformemente al ramo «Altri endpoint».

Dati continui

Innanzitutto, si verifica se i dati per gli endpoint continui sono monotoni mediante trasformazione di rango dei dati, l'approssimazione a un modello ANOVA e il raffronto dei contrasti lineari e quadratici. Se i dati sono monotoni, occorre applicare un test di tendenza regressivo di Jonckheere-Terpstra alle mediane delle repliche senza effettuare alcun'altra analisi successiva. Un'alternativa per i dati normalmente distribuiti con varianze omogenee è il test regressivo di Williams. Se non sono monotoni (il contrasto quadrato è significativo e il contrasto lineare è non significativo), i dati devono essere analizzati utilizzando un modello ANOVA a effetti misti. I dati devono quindi essere valutati per verificare la normalità (preferibilmente con il test di Shapiro-Wilk o di Anderson-Darling) e l'omogeneità della varianza (preferibilmente con il test di Levene). Entrambi i test utilizzano i dati residui di un modello ANOVA a effetti misti. È possibile sostituire, previo giudizio di un esperto, tali test formali di normalità e omogeneità della varianza, ma questi ultimi sono comunque preferibili. Se i dati presentano una distribuzione normale e una varianza omogenea, i presupposti di un modello ANOVA a effetti misti sono soddisfatti e il test di Dunnett premette di determinare gli effetti significativi del trattamento. In caso di «non normalità» o di «eterogeneità della varianza» le ipotesi del test di Dunnett sono violate e si cerca di trasformare i dati per ottenerne la distribuzione normale e di stabilizzare la varianza. Se non si trova alcuna trasformazione di questo tipo, si determinano gli effetti significativi del trattamento con il test di Dunn. Se possibile, è opportuno effettuare un test unilaterale anziché bilaterale, ma è necessario il giudizio di un esperto per determinare quale test sia adeguato per un determinato endpoint.

Mortalità

I dati sulla mortalità dovrebbero essere analizzati per il periodo di tempo che comprende l'intera prova e dovrebbero essere espressi in percentuale dei decessi in una determinata vasca. I girini che non hanno completato la metamorfosi in un determinato periodo di tempo, i girini che fanno parte della coorte di sottocampioni di larve, le rane giovani che sono soppresse e tutti gli altri animali morti per errore sperimentale sono trattati come dati censurati e non inclusi nel denominatore del rapporto per il calcolo del valore percentuale. Prima di qualsiasi analisi statistica le proporzioni di mortalità sono trasformate per la radice quadrata dell'arcoseno. In alternativa si può utilizzare il test regressivo di Cochran-Armitage, eventualmente con correzione di tipo Rao-Scott in presenza di dispersione eccessiva.

Peso e lunghezza (dati relativi alla crescita)

I maschi e le femmine non sono dimorfici sessualmente durante la metamorfosi, pertanto i dati relativi alla crescita del sottocampione di larve dovrebbero essere analizzati indipendentemente dal sesso. Tuttavia, i dati relativi alla crescita delle rane allo stadio giovanile dovrebbero essere analizzati separatamente in funzione del sesso genetico. Può essere necessaria una trasformazione logaritmica per questi endpoint, in quanto non è raro che i dati relativi alla dimensione seguano una legge log-normale.

▼M8

Indice epatosomatico (LSI)

I pesi del fegato devono essere normalizzati in funzione del peso del corpo intero (cioè, LSI) e analizzati separatamente in funzione del sesso genetico.

Tempo fino allo stadio NF62

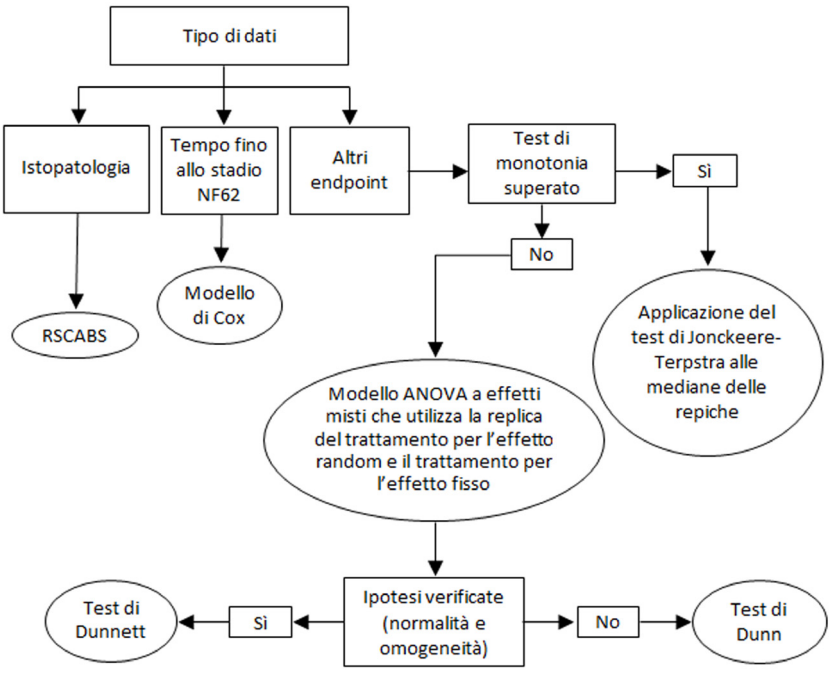
I dati relativi al tempo trascorso fino alla metamorfosi sono trattati come dati di tipo "time-to-event"; i decessi o individui che non raggiungono lo stadio NF62 in 70 giorni sono trattati come dati censurati a destra (ossia, il valore reale è superiore a 70 giorni, ma lo studio termina prima che gli animali abbiano raggiunto lo stadio NF62 in 70 giorni). Il tempo mediano fino allo stadio NF62, che corrisponde al completamento della metamorfosi, in controlli contenenti acqua di diluizione è utilizzato per determinare la data del completamento della prova. Il tempo mediano fino al completamento della metamorfosi potrebbe essere determinato mediante stimatori del prodotto-limite di Kapian-Meier. Questo endpoint dovrebbe essere analizzato utilizzando un modello a effetti misti a rischi proporzionati di Cox, che tiene conto della struttura delle repliche dello studio.

Dati istopatologici (indice di gravità e fasi di sviluppo)

I dati istopatologici sono costituiti da indici di gravità o fasi di sviluppo. Una prova denominata RSCABS (*Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices*) utilizza un test di tendenza Cochran-Armitage con correzione di Rao-Scott per ciascun livello di gravità in una risposta istopatologica (Green *et al.*, 2014). La correzione di tipo Rao-Scott permette di tenere conto del disegno sperimentale delle vasche di replica nella prova. La procedura RSCABS «*by Slices*» (per tranche) tiene conto dell'aspettativa biologica secondo la quale la gravità dell'effetto tende ad aumentare con l'aumento delle dosi o delle concentrazioni, pur conservando gli indici individuali e indicando la gravità di qualsiasi effetto riscontrato. La procedura RSCABS non si limita a determinare quali trattamenti sono statisticamente diversi dai controlli (ossia, presentano una patologia più grave rispetto ai controlli), ma permette di determinare anche a quale indice di gravità tale effetto appare, e quindi di collocare l'analisi in un contesto fortemente necessario. Per determinare gli stadi di sviluppo delle gonadi e dei dotti riproduttivi, occorre sottoporre i dati a un'ulteriore manipolazione, in quanto un'ipotesi del test RSCABS è che la gravità degli effetti aumenta con la dose. L'effetto osservato potrebbe corrispondere a un ritardo o un'accelerazione dello sviluppo. È pertanto opportuno analizzare i dati sugli stadi di sviluppo come indicato al fine di individuare un'accelerazione nello sviluppo e quindi invertirli manualmente prima di effettuare una seconda analisi per individuare un eventuale ritardo nello sviluppo.

Figura 1

Albero decisionale per l'analisi statistica dei dati del LAGDA



▼**M8**

BIBLIOGRAFIA

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry, 33, 1 108-1 116.

▼M8

Appendice 8

CONSIDERAZIONI DI CUI TENER CONTO PER MONITORARE E RIDURRE AL MINIMO LA FREQUENZA DELLA SCOLIOSI

La scoliosi idiopatica, che di solito si manifesta come una «coda piegata» nei girini della specie *Xenopus laevis*, può complicare le osservazioni morfologiche e comportamentali nelle popolazioni di prova. Occorre adoperarsi per ridurre al minimo o eliminare l'incidenza della scoliosi, sia negli animali che nelle condizioni sperimentali. Nella prova definitiva si raccomanda che l'incidenza della scoliosi moderata e grave sia inferiore al 10 %, per aumentare la fiducia nella capacità della prova di individuare gli effetti sullo sviluppo correlati al trattamento in larve di anfibi altrimenti in buona salute.

Le osservazioni giornaliere durante la prova definitiva devono registrare sia l'incidenza (conteggio individuale) sia la gravità della scoliosi, se presente. La natura dell'anomalia va descritta con riferimento alla localizzazione (ad esempio, anteriore o posteriore alla cloaca) e la direzione della curvatura (ad esempio, laterale o dorso-ventrale). La gravità può essere classificata come segue:

(NR) Non significativa: nessuna curvatura presente

(1) Minima: leggera curvatura laterale posteriore alla cloaca; apparente solo a riposo

(2) Moderata: curvatura laterale posteriore alla cloaca; visibile in qualsiasi momento ma non inibisce il movimento

(3) Grave: curvatura laterale anteriore alla cloaca; OPPURE qualsiasi curvatura che impedisca il movimento; OPPURE qualsiasi curvatura dorso-ventrale

Un gruppo consultivo scientifico dell'Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti (US EPA) per le norme FIFRA (FIFRA SAP 2013) ha esaminato i dati sintetici relativi alla scoliosi nell'ambito di quindici saggi di metamorfosi degli anfibi sulla specie *X. laevis* (stadi 51-60+) e ha formulato raccomandazioni generali per ridurre la prevalenza di questa anomalia nelle popolazioni sperimentali. Le raccomandazioni sono pertinenti per il LAGDA, anche se questa prova implica un calendario di sviluppo più lungo.

Dati storici relativi alla deposizione delle uova

In generale, adulti sani e di qualità superiore dovrebbero essere utilizzati come coppie riproduttrici; l'eliminazione di coppie riproduttrici che generano prole con scoliosi può ridurne al minimo l'apparizione di tale patologia nel corso del tempo. In particolare, può essere utile ridurre al minimo il ricorso a riproduttori catturati allo stato selvatico. Il periodo di esposizione del LAGDA inizia con gli embrioni dello stadio NF8-10 e non è possibile determinare all'inizio della prova se determinati individui manifesteranno una scoliosi. Pertanto, oltre al monitoraggio dell'incidenza della scoliosi negli animali sottoposti a prova, è opportuno documentare i dati storici relativi alla deposizione delle uova (compresa la prevalenza della scoliosi nelle larve autorizzate a svilupparsi). Può essere utile monitorare ulteriormente la porzione delle uova deposte non utilizzata in un determinato studio e rendere conto di tali osservazioni (FIFRA SAP 2013).

Qualità dell'acqua

È importante garantire un'adeguata qualità dell'acqua, sia nello stock di laboratorio che durante la prova. Oltre ai criteri di qualità dell'acqua periodicamente valutata ai fini della tossicità, può essere utile monitorare le eventuali carenze nutrizionali e correggerle (*e.g.*, carenza di vitamina C, calcio, fosforo) o livelli eccessi di selenio e rame, che sono indicati come elementi che possono indurre la scoliosi a livelli variabili nelle specie *Rana* e *Xenopus* allevate in laboratorio. (Marshall *et al.* 1980; Leibovitz *et al.* 1992; Martinez *et al.* 1992; come indicato in FIFRA SAP 2013). L'applicazione di un regime alimentare adeguato (cfr. appendice 4) e la pulizia regolare delle vasche migliorano in generale la qualità dell'acqua e la salute degli organismi sperimentali.

▼**M8**

Alimentazione

Le raccomandazioni specifiche in materia di regime alimentare, risultate efficaci nel LAGDA, sono descritte in dettaglio nell'appendice 4. Si raccomanda di controllare la presenza, nelle fonti dei mangimi, di tossine biologiche, erbicidi e altri pesticidi che sono notoriamente causa di scoliosi in *X. laevis* o altri animali acquatici (Schlenk e Jenkins 2013). Ad esempio, l'esposizione ad alcuni inibitori della colinesterasi è stata associata alla scoliosi nei pesci (Schultz *et al.* 1985) e nelle rane (Bacchetta *et al.* 2008).

BIBLIOGRAFIA

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. Science of the Total Environment 392: 110 — 118

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. Journal of the World Aquaculture Society 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraez, and P. Herraez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314-320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. May 21-23, 2013. Washington, DC.