

PARTE C: METODI PER LA DETERMINAZIONE DELLA ECOTOSSICITÀ

INTRODUZIONE GENERALE: PARTE C

I metodi di prova di seguito descritti servono alla determinazione di alcune proprietà ecotossicologiche enumerate nell'allegato VIII della direttiva 79/831/CEE. Il notificatore deve tener presente che i metodi per la determinazione delle seguenti proprietà previste al livello 1 dell'allegato VIII non sono inclusi nel testo:

- studio di tossicità prolungata sulla *Daphnia magna*,
- prova su una pianta superiore,
- studio di tossicità prolungata su un pesce.

Quando opportuni metodi di prova per la determinazione di queste proprietà saranno ultimati, saranno pubblicati sotto forma di un ulteriore adeguamento al progresso tecnico. Nel frattempo il notificatore deve applicare metodi opportuni, internazionalmente riconosciuti, che devono essere specificati all'autorità competente.

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 cloroacetamide 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)

- 10% di torba di stagno (con pH più vicino possibile a 5,5-6,0, priva di residui visibili di piante e finemente macinata);
- 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 $6,0 \pm 0,5$.

b) Substrato per il saggio

Il substrato per il saggio contiene il 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. Il 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 (\pm 2 °C) ed illuminate in continuazione. L'intensità luminosa dovrebbe essere compresa 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.

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.

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),
- 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 France, Écologie 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: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

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 zootecche 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.

C. 9

BIODEGRADAZIONE

ZAHN-WELLENS TEST

1. METODO

1.1. Introduzione

Il metodo è destinato a valutare la potenziale biodegradabilità ultima ⁽¹⁾ delle sostanze organiche idrosolubili e non volatili esposte a concentrazioni relativamente elevate di microorganismi nel corso di un saggio statico.

Può verificarsi un assorbimento chimico-fisico della sostanza in esame sui solidi sospesi; di ciò si dovrà tener conto nell'interpretare i risultati (vedi punto 3.2).

Le sostanze da studiare vengono impiegate a concentrazioni corrispondenti a valori del DOC compresi fra 50 e 400 mg/l o a valori del COD compresi fra 100 e 1 000 mg/l (DOC = carbonio organico disciolto; COD = domanda chimica di ossigeno). Dette concentrazioni, relativamente elevate, hanno il vantaggio dell'attendibilità analitica. I composti dotati di proprietà tossiche possono ritardare o inibire il processo di degradazione.

In questo metodo, la misura della concentrazione del carbonio organico disciolto o la richiesta chimica di ossigeno vengono impiegate per valutare la biodegradazione ultima della sostanza in esame.

L'impiego simultaneo di un metodo di analisi specifico può permettere di valutare la biodegradazione primaria della sostanza (modifica della struttura chimica della sostanza in esame).

Il metodo può essere applicato soltanto all'esame di quelle sostanze organiche le quali, alle concentrazioni impiegate per la prova:

- sono solubili in acqua nelle condizioni sperimentali;
- hanno una tensione di vapore trascurabile nelle condizioni sperimentali;
- non esercitano effetti inibitori sui batteri;
- sono assorbite soltanto in misura limitata nel sistema sperimentale;
- non vanno perdute per effetto della formazione di schiume nella soluzione in esame.

La disponibilità di dati sulle proporzioni relative dei principali componenti del materiale da esaminare sarà utile per interpretare i risultati, particolarmente nei casi in cui i risultati sono bassi o trascurabili.

Per poter interpretare i risultati più bassi e per poter scegliere le opportune concentrazioni sperimentali sarà altresì utile disporre di dati sulla tossicità della sostanza nei confronti dei microorganismi.

1.2. Definizioni ed unità

Il livello di degradazione raggiunto alla fine dell'esperimento, denominato «biodegradabilità nel Zahn-Wellens Test», è dato dall'espressione:

$$D_T (\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})} \right] \times 100$$

D_T = biodegradazione (%) al tempo T

C_A = valori del DOC (o del COD) della miscela in esame, espressi in mg/l e misurati tre ore dopo l'inizio della prova (DOC = carbonio organico disciolto, COD = domanda chimica di ossigeno)

C_T = valori del DOC o del COD nella miscela in esame al momento del prelievo (mg/l)

C_B = valori del DOC o del COD relativi al «bianco» al momento del prelievo (mg/l)

C_{BA} = valori del DOC o del COD del «bianco», misurati tre ore dopo l'inizio della prova (mg/l)

L'entità della degradazione dev'essere arrotondata all'unità percentuale.

La degradazione percentuale si esprime come eliminazione percentuale del DOC (o del COD) della sostanza sperimentata.

La differenza tra il valore misurato dopo tre ore e il valore calcolato, o preferibilmente misurato inizialmente, può fornire informazioni utili in merito all'eliminazione della sostanza (vedi punto 3.2: «Interpretazione dei risultati»).

⁽¹⁾ I termini «ultima» e «primaria», riferiti alla biodegradazione, sono traduzioni dei termini inglesi «ultimate» e «primary», rispettivamente.

1.3. **Sostanze di riferimento**

In taluni casi, quando vengono studiate sostanze nuove, può essere utile l'impiego di sostanze di riferimento. Tuttavia, non possono ancora essere raccomandate specifiche sostanze di riferimento.

1.4. **Principio del metodo**

In un recipiente di vetro da 1 a 4 litri, provvisto di agitatore e aereatore, vengono introdotti contemporaneamente il fango attivo, le sostanze nutritive minerali e il materiale da esaminare, quale unica fonte di carbonio, in soluzione acquosa. La miscela viene agitata ed aereata alla temperatura di 20-25 °C, sotto illuminazione diffusa o in camera oscura, per la durata massima di 28 giorni. Il processo di degradazione viene seguito mediante determinazione dei valori del COD o del DOC nella soluzione filtrata, eseguita giornalmente o comunque ad intervalli appropriati e regolari. Il rapporto fra il DOC (o il COD) eliminato dopo ciascun intervallo ed il valore a tre ore dall'inizio viene espresso come biodegradazione percentuale e serve per misurare l'entità della degradazione in quel momento. Diagrammando tale valore in funzione del tempo si costruisce la curva di biodegradazione. Impiegando un metodo analitico specifico è possibile misurare le variazioni di concentrazione della sostanza in esame dovute alla biodegradazione (biodegradabilità primaria).

1.5. **Criteri di qualità**

Prove d'intercalibrazione tra laboratori hanno dimostrato che la riproducibilità di questo metodo è soddisfacente.

La sensibilità del metodo è determinata principalmente dalla variabilità del «bianco» e, in misura minore, dalla precisione con cui è possibile determinare il carbonio organico disciolto e la quantità del composto da esaminare contenuto nel mezzo.

1.6. **Descrizione del metodo**

1.6.1. **Preparazioni**

1.6.1.1. **Reattivi**

— Acqua per il saggio: acqua potabile a contenuto di carbonio organico inferiore a 5 mg/l. La concentrazione globale degli ioni calcio e magnesio non deve superare 2,7 mmol/l; in caso contrario sarà necessaria un'opportuna diluizione con acqua deionizzata o distillata

— Acido solforico, p.a., 50 g/l

— Soluzione di idrossido di sodio, p.a., 40 g/l

— Soluzione nutritiva minerale: sciogliere in 1 litro d'acqua deionizzata:
cloruroammonico, NH_4Cl , p.a. 38,5 g
ortofosfato monosodico diidrato $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, p.a. 33,4 g
ortofosfato monopotassico, KH_2PO_4 , p.a. 8,5 g
ortofosfato dipotassico, K_2HPO_4 , p.a. 21,75 g

La miscela serve contemporaneamente da sostanza nutritiva e da tampone.

1.6.1.2. **Apparecchiatura**

Recipienti cilindrici di vetro, del volume da 1 a 4 litri

Dispositivo di agitazione. L'agitatore vero e proprio, di vetro o metallo, dev'essere sostenuto da un albero adatto e deve girare a 5-10 cm circa dal fondo del recipiente. Si può anche impiegare un agitatore magnetico, con barretta da 7 a 10 cm di lunghezza

Tubo di vetro, del diametro interno di 2-4 mm, per l'introduzione dell'aria. L'apertura del tubo deve trovarsi a 1 cm circa sopra il fondo del recipiente

Centrifuga (3 550 giri circa)

pH-metro

Misuratore dell'ossigeno disciolto

Filtri di carta

Apparecchiatura per filtrazione su membrana

Filtri a membrana, porosità 0,45 μm . I filtri a membrana sono adatti solo a condizione che non cedano carbonio organico e non assorbano la sostanza durante la filtrazione

Apparecchiatura analitica per la determinazione del contenuto in carbonio organico e della domanda chimica di ossigeno

1.6.1.3. Preparazione dell'inoculo

Lavare il fango attivo proveniente da un impianto di trattamento biologico centrifugando o lasciando sedimentare ripetutamente con l'acqua per il saggio (vedi sopra).

Il fango attivo deve trovarsi in idonee condizioni. Esso può essere prelevato da un impianto di trattamento di acque di scarico in buone condizioni di funzionamento. Per ottenere il maggior numero possibile di specie o ceppi differenti di batteri è preferibile mescolare gli inoculi provenienti da varie fonti (per esempio: vari impianti di trattamento, estratti di suoli, acque di fiume, ecc.). La miscela deve essere trattata come descritto sopra.

Per controllare l'attività del fango attivo vedi oltre il paragrafo «Controllo funzionale».

1.6.1.4. Preparazione delle soluzioni da esaminare

Nel recipiente per il saggio, introdurre 500 ml dell'acqua per il saggio, insieme alla soluzione nutritiva minerale in quantità pari a 2,5 ml/l e al fango attivo in quantità corrispondente a 0,2-1,0 g/l di materiale secco nella miscela finale. Aggiungere la soluzione madre della sostanza da esaminare in quantità tale da ottenere un DOC da 50 a 400 mg/l nella miscela finale. I corrispondenti valori del COD saranno da 100 a 1 000 mg/l. Portare con l'acqua di cui sopra al volume totale da 1 a 4 litri. Il volume totale da scegliere dipende dal numero dei campioni da prelevare per le determinazioni del DOC o del COD, nonché dai volumi necessari per il procedimento analitico.

Normalmente, un volume di 2 litri può essere considerato soddisfacente.

Per ciascuna serie di saggi va preparato almeno un recipiente di controllo (bianco): esso deve contenere soltanto il fango attivo e la soluzione nutritiva minerale portata allo stesso volume totale dei recipienti per il saggio.

1.6.2. Esecuzione del saggio

Si agita il contenuto dei recipienti per il saggio con agitatori magnetici od a spirale, sotto illuminazione diffusa o in camera oscura e alla temperatura di 20-25 °C. L'aerazione dev'essere ottenuta insufflando aria compressa purificata facendola passare attraverso un tampone di cotone e, se necessario, una bottiglia di lavaggio. Si farà in modo che il fango non si depositi e che la concentrazione dell'ossigeno non scenda al di sotto di 2 mg/l.

Il valore del pH deve essere controllato ad intervalli regolari (ad esempio quotidianamente) e regolato se necessario sul valore di 7-8.

Le perdite dovute all'evaporazione andranno compensate immediatamente prima di ogni prelievo aggiungendo acqua deionizzata o distillata nelle quantità richieste. Sarà particolarmente utile segnare il livello del liquido sul recipiente prima di avviare la prova. Dopo ogni campionamento (in assenza di aerazione e agitazione) si apporranno nuovi contrassegni. I primi campioni dovranno sempre essere prelevati tre ore dopo l'inizio della prova per verificare se ha luogo un assorbimento del materiale in esame da parte del fango attivo.

L'eliminazione della sostanza in esame dev'essere seguita mediante determinazioni del DOC e del COD, effettuate quotidianamente o ad intervalli comunque regolari. I campioni prelevati dal recipiente di saggio e dal «bianco» devono essere filtrati su carta accuratamente lavata. I primi 5 ml del filtrato della soluzione devono essere scartati. I fanghi difficilmente filtrabili possono essere eliminati in precedenza centrifugando per 10 minuti. Le determinazioni del COD e del DOC devono essere effettuate almeno in doppio. L'esperimento deve proseguire per la durata di 28 giorni.

Nota: I campioni che rimangono torbidi devono essere filtrati attraverso filtri a membrana. Questi ultimi non devono cedere od assorbire materiale organico.

Controllo funzionale del fango attivo

In parallelo a ciascuna serie di esperimenti, deve essere saggiata una sostanza nota, destinata a controllare la capacità funzionale del fango attivo. A questo scopo si è mostrato utile il glicoldietilenico.

Adattamento

Qualora si eseguano analisi ad intervalli relativamente brevi (ad esempio quotidianamente), l'adattamento può essere chiaramente controllato dalla curva di degradazione (vedi figura 2). Il saggio, pertanto, non deve essere avviato immediatamente prima dell'interruzione di fine settimana.

Qualora l'adattamento si verifichi verso la fine del periodo di saggio, il saggio stesso può essere prolungato fino al momento in cui la degradazione è terminata.

Nota: Se è necessaria una conoscenza più vasta del comportamento dei fanghi adattati, lo stesso fango attivo deve essere posto nuovamente a contatto con lo stesso materiale di prova, procedendo come segue:

arrestare l'agitatore e l'aeratore e lasciar sedimentare il fango attivo; eliminare il surnatante, riempire fino a 2 litri con acqua per il saggio, agitare per 15 minuti e lasciare nuovamente sedimentare; eliminare nuovamente il surnatante e impiegare il fango rimanente per ripetere il saggio con gli stessi materiali conformemente a quanto indicato ai precedenti punti 1.6.1.4 e 1.6.2. Il fango attivo può essere isolato anche per centrifugazione anziché per sedimentazione.

Il fango adattato può essere mescolato con fango fresco, fino ad una quantità totale di 0,2-1 g di sostanza secca per litro.

Mezzi analitici

Normalmente i campioni vengono filtrati attraverso un filtro di carta accuratamente lavato (per il lavaggio, impiegare acqua deionizzata).

I campioni che restano torbidi devono essere filtrati con filtri a membrana (0,45 µm).

La concentrazione del DOC dev'essere determinata in doppio sul campione filtrato (scartando i primi 5 ml) con apparecchiatura per la determinazione del TOC. Se il filtrato non può essere analizzato lo stesso giorno, esso va conservato in frigorifero fino al giorno successivo. Una conservazione più lunga non è da raccomandarsi.

La concentrazione del COD va determinata sul campione filtrato con il procedimento analitico descritto nel riferimento (bibliografico 2).

2. DATI E VALUTAZIONE

Le concentrazioni del DOC e del COD devono essere determinate almeno in doppio in ogni campione secondo quanto indicato al punto 1.6.2. La degradazione al momento T viene calcolata mediante la formula riportata (insieme alle definizioni) al punto 1.2.

La misura della degradazione dev'essere arrotondata all'unità percentuale. L'entità della degradazione raggiunta, alla fine dell'esperimento viene definita come «biodegradabilità secondo Zahn-Wellens».

Nota: Qualora la degradazione completa venga raggiunta prima che il tempo necessario per il saggio sia terminato e questo risultato sia confermato da una seconda analisi effettuata il giorno successivo, il saggio può essere considerato concluso.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- la concentrazione iniziale della sostanza,
- tutte le altre informazioni e risultati sperimentali concernenti la sostanza esaminata, la sostanza di riferimento (se impiegata) e il «bianco»,
- la concentrazione dopo tre ore,
- la curva di biodegradazione con la relativa descrizione,
- la data e la località di prelievo dei microorganismi usati per l'esperimento, lo stato di adattamento, la concentrazione impiegata, ecc.
- le giustificazioni scientifiche per qualsiasi modifica apportata al procedimento sperimentale.

3.2. Interpretazione dei risultati

La rimozione del DOC (o del COD) che si verifica gradualmente entro giorni o settimane indica che la sostanza in esame sta subendo biodegradazione.

In taluni casi può comunque entrare in gioco l'assorbimento chimico-fisico, denotato dal fatto che la scomparsa si verifica in modo completo o parziale fin dall'inizio, entro le prime tre ore e che la differenza di risposta tra i surnatanti del controllo e del saggio rimane a livelli inaspettatamente bassi.

Se si vuole distinguere fra la biodegradazione (o biodegradazione parziale) e l'assorbimento, sono necessari ulteriori saggi.

Ciò può essere fatto in numerosi modi, ma il metodo più convincente consiste nell'impiegare il surnatante quale inoculo in una prova del dossier di base (preferibilmente un saggio respirometrico).

Le sostanze che, nel corso di questo saggio, mostrano un'elevata eliminazione del DOC (o del COD) non dovuta ad assorbimento devono essere considerate potenzialmente biodegradabili. Una rimozione parziale, non dovuta ad assorbimento indica che il prodotto chimico è soggetto almeno in parte alla biodegradazione.

Una rimozione bassa o nulla del DOC (o del COD) può essere dovuta all'inibizione dei microorganismi da parte delle sostanze in esame: ciò può anche essere rivelato dalla lisi e dalla perdita di fango, accompagnata dalla formazione di surnatanti torbidi. In questo caso il saggio deve essere ripetuto impiegando la sostanza in esame a concentrazione minore.

L'impiego di un metodo di analisi specifico per la sostanza in esame o della sostanza marcata con ^{14}C può consentire una maggiore sensibilità. Nel caso di composto marcato al ^{14}C , il recupero di $^{14}\text{CO}_2$ confermerà che la biodegradazione è avvenuta.

Quando i risultati sono espressi in termini di biodegradazione primaria, dovrà essere fornita, possibilmente, una spiegazione della modifica di struttura chimica che conduce alla diminuzione di risposta della sostanza in esame.

Si deve dimostrare la validità del metodo analitico e fornire la risposta ottenuta sul «bianco».

4. BIBLIOGRAFIA

- (1) OCSE, Parigi 1981, *Linea Guida 302 B*, decisione C(81) 30 def. del Consiglio.
- (2) Allegato V C.9 Degradazione: Domanda chimica di ossigeno; direttiva 84/449/CEE della Commissione, *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* n. L 251 del 19 settembre 1984.

Appendice

ESEMPIO DI VALUTAZIONE

Composto organico: acido 4-etossibenzoico
Concentrazione teorica della sostanza: 600 mg/l
DOC teorico: 390 mg/l
Inoculo: impianto di trattamento delle acque fognarie di . . .
Concentrazione: 1 g di sostanza secca
Stato di adattamento: non adattato
Analisi: determinazione DOC
Quantità del campione: 3 ml
Sostanza di controllo: glicoldietilenico
Tossicità del composto: nessun effetto tossico al di sotto di 1 000 mg/l
 (metodo utilizzato: saggio in tubi di fermentazione)

Tempi di analisi	Sostanza di riferimento				Sostanza in esame		
	Bianco DOC ⁽¹⁾ mg/l	DOC ⁽¹⁾ mg/l	DOC netto mg/l	Degradazione %	DOC ⁽¹⁾ mg/l	DOC netto mg/l	Degradazione %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 ore	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 giorno	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 giorni	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 giorni	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 giorni	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 giorni	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 giorni	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 giorni	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 giorni	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

⁽¹⁾ Valore medio di tre determinazioni.

Figura 1

Esempio di curve di biodegradazione

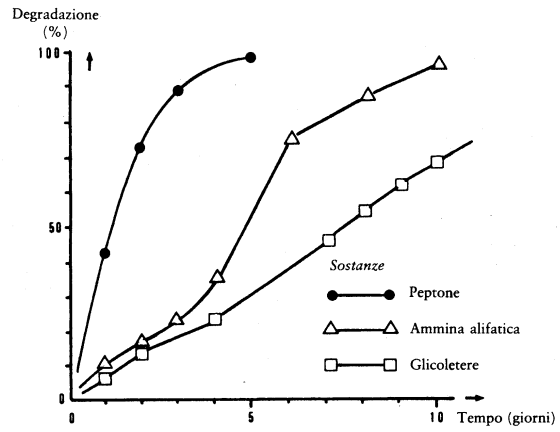
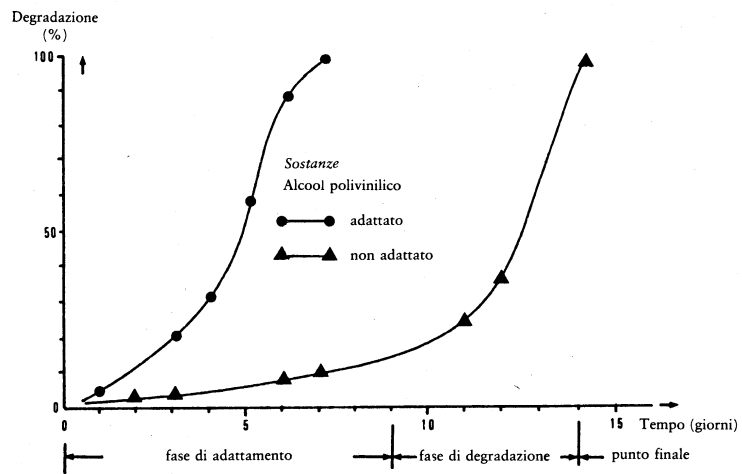


Figura 2

Esempio di adattamento dei fanghi



C. 10

BIODEGRADAZIONE

SAGGIO DI SIMULAZIONE CON FANGHI ATTIVI

1. METODO

1.1. Introduzione

1.1.1. Osservazioni generali

Il metodo può essere applicato esclusivamente a quelle sostanze organiche che, alle concentrazioni impiegate per il saggio:

- sono solubili in acqua nella misura necessaria per la preparazione delle soluzioni per il saggio,
- hanno, nelle condizioni del saggio, una tensione di vapore trascurabile,
- non esercitano effetti inibitori sui batteri.

La disponibilità di dati sulle proporzioni relative dei principali componenti del prodotto da esaminare sarà utile per interpretare i risultati ottenuti, in particolare in quei casi in cui i valori trovati sono bassi o non significativi.

È auspicabile poter disporre di dati sulla tossicità della sostanza nei confronti dei microorganismi per l'interpretazione di eventuali bassi valori e per la scelta delle concentrazioni sperimentali appropriate.

1.1.2. Determinazione della biodegradabilità ultima (analisi DOC/COD) ⁽¹⁾

Scopo del metodo è la determinazione della biodegradabilità ultima mediante misura della rimozione della sostanza e di qualsiasi metabolita in un impianto modello a fanghi attivi, ad una concentrazione > 12 mg DOC/l (o a circa 40 mg COD/l). Sembrano ottimali 20 mg DOC/l (DOC = carbonio organico disciolto/litro; COD = domanda chimica di ossigeno).

Si deve determinare il contenuto di carbonio organico (o la domanda chimica di ossigeno) del materiale in esame.

1.1.3. Determinazione della biodegradabilità primaria (analisi specifica) ⁽¹⁾

Scopo del metodo è la determinazione della biodegradabilità primaria di una sostanza in un impianto pilota a fanghi attivi, a una concentrazione di circa 20 mg/l, con l'impiego di un metodo analitico specifico (se il metodo analitico e la tossicità della sostanza lo consentono, si può usare una concentrazione più bassa o più elevata). Questo consente la valutazione della biodegradabilità primaria della sostanza (modifica della struttura chimica della sostanza in esame).

Il metodo non è destinato alla determinazione della mineralizzazione della sostanza esaminata.

Per la determinazione della sostanza esaminata occorre disporre di un metodo analitico adeguato.

1.2. Definizioni e unità

1.2.1. Analisi DOC/COD

Il grado di rimozione della sostanza è dato da:

$$DR = \frac{T - (E - E_0)}{T} \times 100\% \quad [1 a)]$$

dove:

DR = grado di rimozione percentuale del DOC (o del COD) relativo alla sostanza in esame entro il tempo medio di ritenzione fissato

T = concentrazione della sostanza in esame nell'affluente in mg DOC/litro (o mg COD/litro)

E = concentrazione del DOC (o del COD) nell'effluente dell'unità per il saggio in mg DOC/litro (o mg COD/litro)

E₀ = concentrazione del DOC (o del COD) nell'effluente dell'unità per il «bianco» in mg DOC/litro (o mg COD/litro)

La degradazione si definisce come la rimozione percentuale di DOC (o di COD), nel tempo di ritenzione fissato, relativo alla sostanza in esame.

⁽¹⁾ I termini «ultima» e «primaria», riferiti alla biodegradazione, sono traduzioni dei termini inglesi «ultimate» e «primary», rispettivamente.

1.2.2. *Analisi specifica*

L'eliminazione percentuale della sostanza esaminata dalla fase acquosa (R_w), nel tempo medio di ritenzione fissato, si ricava da:

$$R_w = \frac{C_i - C_o}{C_i} \times 100 \% \quad [1 b])$$

dove:

C_i = concentrazione della sostanza nell'affluente dell'unità per il saggio (mg di sostanza/litro, determinata con l'analisi specifica)

C_o = concentrazione della sostanza nell'effluente dell'unità per il saggio (mg di sostanza/litro, determinata con l'analisi specifica)

1.3. *Sostanze di riferimento*

In alcuni casi, quando si esamina una nuova sostanza, possono essere utili delle sostanze di riferimento; ciò nonostante, non è attualmente possibile indicare sostanze di riferimento specifiche.

1.4. *Principio del metodo*

Per la determinazione della biodegradabilità ultima si fanno funzionare in parallelo due unità pilota a fanghi attivi (saggio di conferma dell'OCSE o unità a vaso poroso). La sostanza in esame viene addizionata all'affluente (liquame sintetico o domestico) di una delle unità, mentre l'altra riceve soltanto liquame. Per la determinazione della biodegradazione primaria con l'analisi specifica dell'affluente e dell'effluente si impiega soltanto una unità.

Si misurano le concentrazioni di DOC (o di COD) negli effluenti, oppure si determinano con l'analisi specifica le concentrazioni della sostanza.

Il DOC dovuto alla sostanza in esame non viene misurato ma soltanto specificato. Quando si effettuano le misurazioni del DOC (e del COD), si assume che la differenza fra le concentrazioni medie degli effluenti del saggio e del controllo sia dovuta alla sostanza in esame non degradata.

Quando vengono effettuate analisi specifiche è possibile misurare la variazione della concentrazione della sostanza in esame (biodegradazione primaria).

Si possono fare funzionare le unità seguendo il «sistema delle unità accoppiate», con il procedimento della transinoculazione.

1.5. *Criteri di qualità*

La concentrazione di partenza della sostanza dipende dal tipo di analisi effettuata e dalle sue limitazioni.

1.6. *Descrizione del metodo*

1.6.1. *Preparazione*

1.6.1.1. *Apparecchiatura*

A parte il caso delle analisi specifiche, è necessaria una coppia di unità dello stesso tipo. Possono essere impiegati due sistemi:

Saggio di conferma OCSE

L'apparecchiatura (allegato I) è costituita da un serbatoio (A) per il liquame sintetico, da una pompa di dosaggio (B), da una vasca di aerazione (C), da un sedimentatore (D), una pompa ad aria compressa (E) per riciclare i fanghi attivi e una vasca (F) per raccogliere l'effluente trattato.

I serbatoi (A) e (F) devono essere di vetro o di idoneo materiale plastico, e della capacità di almeno 24 litri. La pompa (B) alimenta con un flusso costante di liquame sintetico la vasca di aerazione; si può impiegare qualsiasi sistema idoneo purché sia in grado di assicurare il flusso e la concentrazione di alimentazione.

Durante il normale funzionamento, l'altezza del sedimentatore (D) è fissata in modo che il volume della soluzione chiarificata contenuto nella vasca di aerazione sia di tre litri. Un diffusore di materiale sinterizzato (G) è sospeso nel recipiente (C) al vertice del cono. La quantità di aria insufflata attraverso l'aeratore può essere determinata con un flussometro. La pompa ad aria compressa (E) è regolata in modo che il fango attivo sia riciclato con continuità e regolarità dal sedimentatore al recipiente di aerazione (C).

«Vaso poroso»

Il vaso poroso è realizzato con fogli di polietilene poroso (spessore 2 mm, dimensione massima dei pori 95 µm), a forma cilindrica del diametro di 14 cm e con una base conica a 45° (figure 1 e 2 dell'allegato II). Il vaso poroso è contenuto in un recipiente impermeabile di plastica idonea del diametro di 15 cm, con una luce sulla parte cilindrica ad una altezza di 17,2 cm che determina il volume (tre litri) del vaso. Nella parte superiore del recipiente interno si trova un anello rigido di sostegno in plastica idonea in modo da avere un'intercapedine di efflusso di 0,5 cm fra il recipiente interno e quello esterno.

I vasi porosi possono essere montati sul fondo di un bagnomaria controllato termostaticamente. Alla base del recipiente interno, dove sono collocati idonei diffusori, si ha un'alimentazione di aria.

I recipienti (A) ed (E) debbono essere di vetro o di plastica idonea ed avere una capacità di almeno 24 litri. La pompa (B) alimenta, con un flusso costante di liquame sintetico, il recipiente di aerazione; si può impiegare qualsiasi sistema atto ad assicurare il flusso e la concentrazione di alimentazione.

Sono necessari dei vasi porosi interni di riserva per sostituire quelli che possono ostruirsi durante l'uso; i vasi ostruiti vengono puliti mediante immersione per 24 ore in una soluzione di ipoclorito seguita da un lavaggio accurato con acqua di rubinetto.

1.6.1.2. Filtrazione

Apparecchiatura per filtrazione su membrana e membrane filtranti con pori da 0,45 µm. Le membrane filtranti sono adatte soltanto se non cedono carbonio organico e non assorbono la sostanza durante la filtrazione.

1.6.1.3. Liquame

Si possono impiegare sia un'idonea alimentazione sintetica, sia liquame domestico.

Esempio di alimentazione sintetica

Sciogliere in un litro di acqua di rubinetto i seguenti composti:

Peptone:	160 mg
Estratto di carne:	110 mg
Urea:	30 mg
NaCl:	7 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O:	4 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O:	2 mg
K ₂ HPO ₄ :	28 mg

Liquame domestico

Dovrebbe essere raccolto fresco ogni giorno dallo stramazzo della vasca di sedimentazione primaria di un impianto che tratta in prevalenza liquami domestici.

1.6.1.4. Soluzione madre della sostanza in esame

Si dovrebbe preparare una soluzione della sostanza in esame, ad esempio all'1%, da aggiungere nell'unità di prova. È necessario fissare la concentrazione della sostanza in modo tale che si conosca il volume necessario per ottenere la concentrazione di prova da aggiungere al liquame o direttamente nell'unità per mezzo di una seconda pompa.

1.6.1.5. Inoculo

Osservazione: Usando liquami domestici, sarebbe superfluo l'impiego di un inoculo a bassa concentrazione batterica, ma si possono usare fanghi attivi.

Possono essere usati svariati inoculi, se ne danno tre esempi adatti:

a) Inoculo da effluente secondario

Si dovrebbe ricavare l'inoculo da un effluente secondario di buona qualità raccolto da un impianto che tratta in prevalenza liquami domestici. Nel periodo compreso fra il campionamento e l'impiego, l'effluente deve essere tenuto in condizioni aerobiche. Per preparare l'inoculo, si filtra il campione su filtro a elevata porosità, scartando i primi 200 ml. Il filtrato è mantenuto in condizioni aerobiche sino al momento dell'uso. L'inoculo deve essere impiegato il giorno stesso del prelievo. Per l'inoculazione occorre impiegarne almeno 3 ml.

b) Inoculo composito

Inoculo da un effluente secondario:

vedi descrizione precedente.

Inoculo da terreno:

si sospendono 100 grammi di terreno (fertile, non sterile) in 1 000 ml di acqua potabile esente da cloro (terreni con un contenuto eccessivo di argilla, sabbia o humus non sono adatti). Dopo agitazione, si lascia riposare la sospensione per 30 minuti. Si filtra il surnatante su carta a elevata porosità, scartando i primi 200 ml. Si sottopone immediatamente il filtrato ad aerazione prolungandola fino al momento dell'uso. L'inoculo deve essere utilizzato il giorno stesso del prelievo.

Inoculo da acque superficiali:

un altro inoculo parziale può ottenersi da acque superficiali semiputride (mesosaprobiche). Si filtra il campione su carta ad elevata porosità, scartando i primi 200 ml. Si mantiene in condizioni aerobiche fino al momento dell'impiego. L'inoculo va utilizzato il giorno stesso del prelievo.

Si mettono insieme i volumi dei tre campioni parziali di inoculo, si mescolano bene e si preleva dal miscuglio ottenuto l'inoculo finale. Per l'inoculazione occorre che esso sia di almeno 3 ml.

c) Inoculo da un fango attivo

Si può usare come inoculo un volume (non più di tre litri) di fango attivo (contenuto in solidi sospesi fino a 2,5 g/l) prelevato dalla vasca di aerazione di un impianto che tratta prevalentemente liquami domestici.

1.6.2. *Procedimento*

Il saggio viene eseguito a temperatura ambiente; questa dovrebbe essere mantenuta fra 18 e 25 °C.

Se è il caso, il saggio può essere condotto a una temperatura più bassa (fino a 10 °C): se la sostanza viene degradata, allora non occorrono, di solito, altre operazioni. In caso contrario il saggio deve essere condotto ad una temperatura costante compresa fra 18 e 25 °C.

1.6.2.1. *Periodo di avviamento: formazione/stabilizzazione del fango delle unità*

Il periodo di formazione/stabilizzazione del fango è il periodo necessario perché la concentrazione dei solidi sospesi del fango attivo ed il funzionamento delle unità pervengano allo stato di regime nelle condizioni operative volute.

Il periodo di avviamento è quello che va dall'istante in cui la sostanza in esame è aggiunta per la prima volta fino all'istante in cui la sua rimozione si stabilizza (valore relativamente costante). Questo periodo non deve superare le sei settimane.

Il periodo di valutazione è di tre settimane a partire dall'istante in cui la rimozione della sostanza in esame raggiunge un valore relativamente costante che è di solito elevato. Per tutte le sostanze che, nelle prime sei settimane, mostrano una degradazione limitata o nulla, si prendono, come periodo di valutazione, le successive tre settimane.

All'inizio si riempie la (le) unità necessaria(e) per una prova con l'inoculo mescolato con l'affluente.

Si mettono allora in funzione l'aeratore [nel caso della unità del saggio di conferma OCSE la pompa ad aria compressa (E)] ed il meccanismo di dosaggio (B).

L'affluente, privo della sostanza da esaminare, deve attraversare il recipiente di aerazione (C) alla velocità di 1 l/h oppure 0,5 l/h; ciò comporta un tempo medio di ritenzione di tre o di sei ore.

La velocità di aerazione dovrebbe essere regolata in modo che il contenuto del recipiente (C) sia mantenuto costantemente in sospensione ed il volume di ossigeno disciolto sia di almeno 2 mg/l.

Va evitata, con mezzi adeguati, la formazione di schiuma. Non si devono usare agenti antischiumogeni che inibiscano il fango attivo.

Il fango accumulatosi nella parte superiore del recipiente di aerazione (C) [per le unità del saggio di conferma OCSE alla base del recipiente di sedimentazione (D) e nel circuito di circolazione] deve essere riportato nella soluzione chiarificata almeno una volta al giorno con l'uso di una spazzola o di qualche altro mezzo appropriato.

Quando il fango ha difficoltà a sedimentare, se ne può aumentare la densità aggiungendo delle porzioni di 2 ml di una soluzione al 5% di cloruro ferrico e ripetendo l'operazione quando necessario.

Si raccoglie l'effluente nel recipiente (E o F) per 20-24 ore e si preleva un campione dopo un'accurata miscelazione. Il recipiente (E o F) deve essere pulito molto bene.

Per poter determinare e controllare l'efficienza del processo, si misurano almeno due volte alla settimana la domanda chimica di ossigeno (COD) o il carbonio organico disciolto (DOC) del filtrato dell'effluente raccolto, come pure del filtrato dell'affluente (usando una membrana con pori di 0,45 µm e scartando i primi 20 ml circa di filtrato).

La riduzione del COD o DOC dovrebbe annullarsi quando si ottiene una degradazione giornaliera abbastanza regolare.

Due volte alla settimana si dovrebbe determinare la quantità (in g/l) di sostanza secca del fango attivo nel recipiente di aerazione. Le unità possono funzionare in due modi: o due volte per settimana si determina la quantità di sostanza secca presente nel fango attivo e se essa supera i 2,5 g/l si deve togliere quella in eccesso; oppure si eliminano giornalmente da ciascun vaso 500 ml di soluzione mista per avere un tempo di ritenzione medio del fango di 6 giorni.

Quando i parametri misurati e calcolati [efficienza del processo (nella rimozione COD o DOC), concentrazione del fango, capacità di sedimentazione del fango, torbidità degli effluenti, ecc.] delle due unità sono sufficientemente stazionari, la sostanza in esame può essere introdotta nell'affluente di una delle unità, secondo il punto 1.6.2.2.

In alternativa, la sostanza in esame può essere introdotta all'inizio del periodo di formazione del fango, specialmente quando come inoculo si aggiunge fango.

1.6.2.2. Procedimento

Si mantengono le condizioni di funzionamento del periodo di avviamento e si aggiunge all'affluente dell'unità di prova una quantità sufficiente (circa l'1%) di soluzione madre del prodotto in esame, in modo da ottenere nel liquame la concentrazione voluta del prodotto (circa 10-20 mg DOC/l o 40 mg COD/l). Ciò si può effettuare o miscelando giornalmente il liquame con la soluzione madre, oppure con un sistema separato di pompaggio. Detta concentrazione può essere raggiunta progressivamente. Se non si hanno effetti tossici della sostanza in esame sul fango attivo, possono essere provate anche concentrazioni più elevate.

L'unità «in bianco» è alimentata soltanto con l'affluente senza aggiunta di sostanze. Per l'analisi si prendono adeguate quantità di effluenti e si filtrano con filtri a membrana (0,45 µm) scartando i primi 20 ml (circa) di filtrato.

I campioni filtrati devono essere analizzati il giorno stesso, in caso contrario vanno opportunamente conservati, per esempio mediante l'aggiunta di 0,05 ml di una soluzione all'1% di cloruro mercurico (HgCl₂) per ogni 10 ml di campione filtrato, oppure mantenendoli alla temperatura da 2 a 4 °C per 24 ore al massimo, oppure al di sotto di -18 °C per periodi più lunghi.

Il periodo di sperimentazione, a partire dall'aggiunta della sostanza in esame, non dovrebbe superare le sei settimane ed il periodo di valutazione dovrebbe durare almeno tre settimane; per il calcolo del risultato finale dovrebbero potersi effettuare da 14 a 20 determinazioni.

Processo a unità accoppiate

L'accoppiamento delle unità si ottiene scambiando, una volta al giorno, fra le due unità, 1,5 litri di soluzione chiarificata (fango incluso) proveniente dalle vasche di aerazione del fango attivo. Nel caso di prodotti in esame fortemente assorbenti, si prelevano dalle vasche di sedimentazione 1,5 litri del solo liquido surnatante e si versano nella vasca di fango attivo dell'altra unità.

1.6.2.3. Analisi

Per seguire il comportamento della sostanza si possono effettuare due tipi di analisi:

— DOC e COD:

le concentrazioni di DOC sono determinate in doppio con l'analizzatore di carbonio e quelle di COD (assieme o in alternativa) col sistema indicato nel riferimento bibliografico (2);

— analisi specifica:

le concentrazioni della sostanza esaminata si determinano con un metodo analitico idoneo. Se possibile, si dovrebbe effettuare una determinazione specifica della sostanza assorbita sul fango.

2. DATI E VALUTAZIONE

2.1. Processo ad unità accoppiate

Quando si impiega il «processo ad unità accoppiate», il grado giornaliero di rimozione DR viene calcolato come indicato al punto 1.2.1. Il valore DR viene quindi corretto in DR_c, per tener conto del trasferimento di sostanza dovuto al procedimento di transinoculazione, mediante l'equazione (2) e l'equazione (3) per tempi medi di ritenzione rispettivamente di tre e di sei ore.

$$DRc = \frac{8}{7} DR - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$DRc = \frac{4}{3} DR - \frac{100}{3} \quad [3]$$

Si calcola la media della serie di valori di DRc ed inoltre la deviazione standard con l'equazione [4]

$$S_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DRc} - DRc_i)^2}{n-1}} \quad [4]$$

dove:

S_{DRc} = deviazione standard della serie di valori di DRc

\overline{DRc} = media dei valori di DRc

n = numero di determinazioni

Si eliminano i valori anomali della serie di DRc secondo un opportuno procedimento statistico, ad esempio Nalimov (6), con un livello di probabilità del 95% e si ricalcolano la media e la deviazione standard della serie di DRc priva di valori anomali (outliers).

Si calcola quindi il risultato finale con l'equazione (5):

$$DRc = \overline{DRc} \pm \frac{t_{n-1; \alpha}}{\sqrt{n}} S_{DRc} \quad [5]$$

dove:

$t_{n-1; \alpha}$ = valore tabulato di t per n coppie di valori di E ed E_0 e l'intervallo fiduciario P ($P = 1 - \alpha$) è stimato al 95% (1)

Il risultato viene espresso come media con limiti di tolleranza al 95%, relativa deviazione standard e numero di dati della serie DRc priva di «outliers» e numero di valori anomali, ad esempio:

DRc = 98,6 ± 2,3% della rimozione del DOC

s = 4,65% della rimozione del DOC

n = 18

x = numero degli «outliers»

2.2. Processo ad unità non accoppiate

Il funzionamento delle unità può essere verificato come segue:

$$\text{percentuale di rimozione del COD o del DOC} = \frac{\text{COD o DOC del liquame} - \text{COD o DOC dell'effluente}}{\text{COD o DOC del liquame}} \times 100$$

Questa rimozione giornaliera può essere riportata in grafico per evidenziare eventuali andamenti, per esempio, verso l'acclimatazione.

2.2.1. Determinazioni attraverso il COD/DOC

Il grado giornaliero di rimozione DR è calcolato come indicato al punto 1.2.1.

Si calcola la media della serie di valori DR ed inoltre la sua deviazione standard con l'equazione:

$$S_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DR} - DR_i)^2}{n-1}} \quad [6]$$

dove:

S_{DR} = deviazione standard della serie di valori di DR_i

\overline{DR} = media dei valori DR_i

n = numero delle determinazioni

Si eliminano gli «outliers» della serie di DR secondo un opportuno procedimento statistico, ad esempio Nalimov (6), con un livello di probabilità del 95 % e si ricalcolano la media e la deviazione standard della serie di DR così epurata.

Il risultato finale è quindi calcolato con l'equazione:

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1; \alpha}}{\sqrt{n}} S_{DR} \quad [7]$$

dove:

$t_{n-1; \alpha}$ = valore tabulato di t per n coppie di valori di E ed E_O e l'intervallo fiduciario P ($P = 1 - \alpha$) dove P è stimato al 95 % (1)

Come risultato vengono presi la media, con limiti di tolleranza ad un livello di probabilità del 95 %, la relativa deviazione standard, il numero di dati della serie DR epurata ed il numero di valore anomali, ad esempio:

DR = (98,6 ± 2,3%) della rimozione del DOC

s = 4,65% della rimozione del DOC

n = 18

x = numero di «outliers»

2.2.2. Determinazione attraverso l'analisi specifica

La percentuale di eliminazione della sostanza in esame dalla fase acquosa (R_w) è calcolata come indicato al punto 1.2.2.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- la scheda fornita nell'allegato III, che mostra le condizioni operative del saggio,
- l'apparecchiatura scelta (prova di conferma OCSE o vaso poroso),
- il procedimento scelto: unità accoppiate o meno,
- il liquame impiegato: sintetico o domestico (nel caso di liquame domestico, data e provenienza del campione),
- tipo di inoculo, con data e provenienza del campione,
- una descrizione del metodo analitico, se sono state effettuate analisi specifiche,
- grafico della rimozione di COD o DOC in funzione del tempo, comprensivo dei periodi di avviamento e di valutazione,
- recupero analitico della sostanza in esame come COD o DOC nella soluzione madre,
- nel caso siano state effettuate analisi specifiche, grafico della rimozione percentuale della sostanza esaminata dalla fase acquosa in funzione del tempo (periodo di avviamento e di valutazione),
- la rimozione media di DOC, COD o della sostanza in esame e la deviazione standard sono calcolate dai risultati del periodo di valutazione, cioè quando si ha una rimozione stazionaria della sostanza in esame o un periodo di funzionamento a regime,
- grafico della concentrazione del fango attivo in funzione del tempo,
- osservazioni riguardanti il fango attivo (scarto di fanghi in eccesso, presenza di rigonfiamenti, FeCl₃, ecc.),
- concentrazione della sostanza usata nel saggio,
- tutti i risultati relativi all'analisi fatta sul fango,
- tutti i dati ed i risultati sperimentali relativi alla sostanza in esame e a quella di riferimento, se impiegata,
- motivazioni scientifiche per eventuali modifiche nel procedimento.

3.2. Interpretazione dei risultati

Una bassa rimozione della sostanza esaminata dalla fase acquosa può essere dovuta all'inibizione dei microorganismi da parte della sostanza in esame. Ciò può anche essere evidenziato da lisi e perdita di fango, che produce un surnatante torbido e da un abbassamento dell'efficienza di rimozione COD (o DOC) dell'impianto pilota.

A volte può svolgere un ruolo l'assorbimento fisico-chimico. Le differenze fra l'azione biologica sulla molecola e l'assorbimento chimico-fisico possono essere rivelati da un'analisi condotta sul fango dopo un adeguato desorbimento.

Se si deve fare la distinzione fra biodegradazione (o parziale biodegradazione) ed assorbimento, sono necessarie ulteriori prove. Ciò si può effettuare in diversi modi, ma il più convincente è usare il surnatante come inoculo in un saggio del dossier di base (preferibilmente un saggio respirometrico).

Se si osservano elevate rimozioni DOC o COD, ciò è dovuto alla biodegradazione, mentre a basse rimozioni la biodegradazione non si può distinguere dall'eliminazione. Ad esempio, se un composto solubile manifesta una elevata costante di assorbimento del 98 % ed il tasso di eliminazione giornaliero del surplus di fango è del 10 %, è possibile un'eliminazione sino al 40 %; con un tasso di eliminazione del surplus di fango del 30 %, l'eliminazione dovuta all'assorbimento ed alla rimozione attraverso il surplus di fango può arrivare fino al 65 % (4).

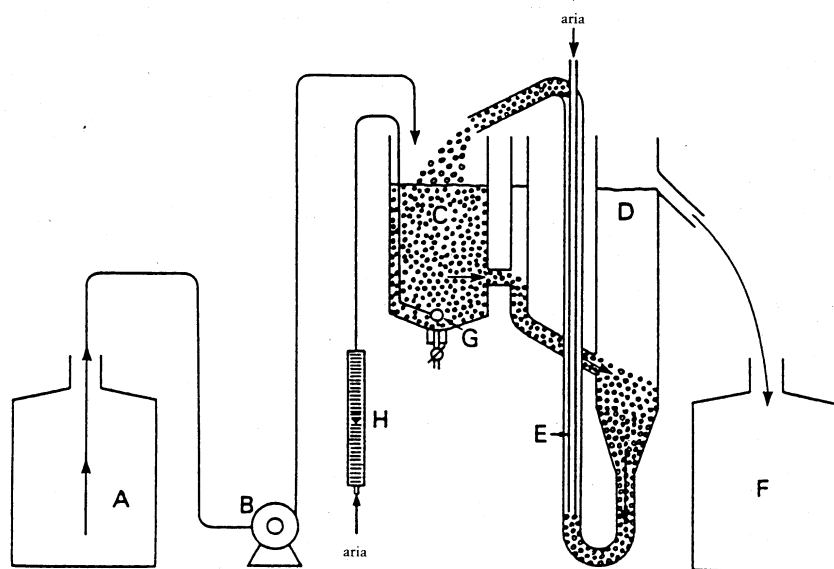
Quando si effettuano analisi specifiche, occorrerebbe fare attenzione alla relazione fra la struttura della sostanza e l'analisi specifica impiegata. In questo caso il fenomeno osservato non può essere interpretato come una mineralizzazione della sostanza.

4. BIBLIOGRAFIA

- (1) OCSE, Parigi 1981, *Linea Guida 303 A*, decisione C(81) 30 def. del Consiglio.
- (2) Allegato V C. 9: Degradation — Chemical Oxygen Demand, direttiva 84/449/CEE della Commissione; *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* n. L 251 del 19 settembre 1984.
- (3) Painter, H. A., King, E. F., *WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability*. Technical Report TR70, giugno 1978, Water Research Center, Regno Unito.
- (4) Wierich, P., Gerike, P., «The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in activated sludge plants», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 5, n. 2, giugno 1981, pagine da 161 a 171.
- (5) Direttive 82/242/CEE e 82/243/CEE del Consiglio (*Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* n. L 109 del 22 aprile 1982), modificate delle direttive 73/404/CEE e 73/405/CEE del Consiglio; Biodegradability of detergents, *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* n. L 347 del 17 dicembre 1973.
- (6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreissertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytischer-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fesenius-Zeitschrift für Analytische Chemie*, 303 (1980) pagine da 406 a 408.

Appendice 1

Figura 1

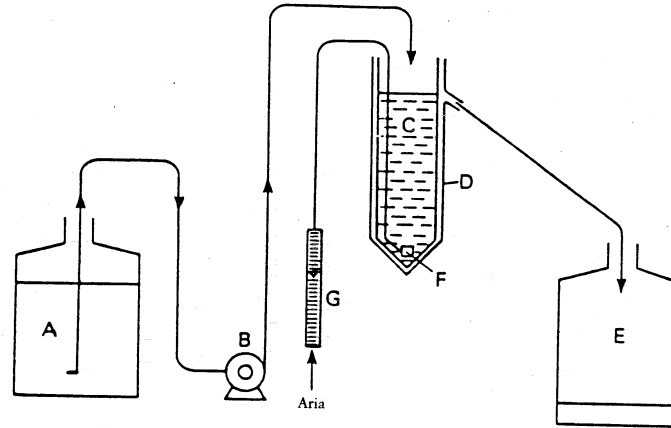


- | | |
|--|--------------------------------|
| A = serbatoio; | E = pompa ad aria compressa; |
| B = pompa di dosaggio; | F = recipiente di raccolta; |
| C = vasca di aerazione (capacità 3 litri); | G = aeratore; |
| D = vasca di sedimentazione; | H = flussometro (facoltativo). |

Appendice 2.

Figura 1

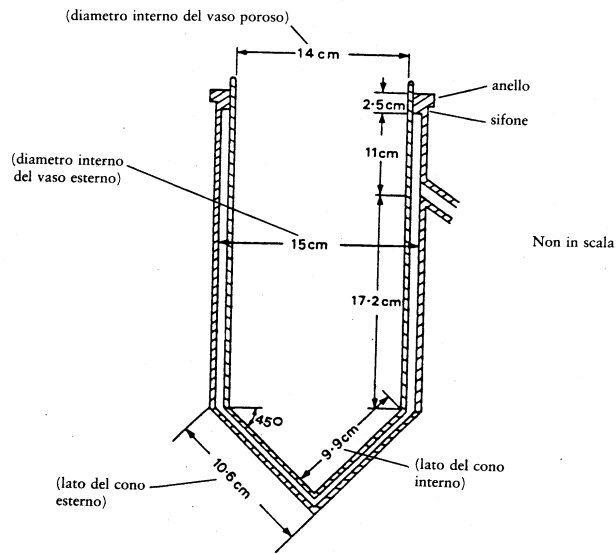
Attrezzatura per la determinazione della biodegradabilità



- A = serbatoio;
- B = pompa di dosaggio;
- C = recipiente poroso di aerazione;
- D = recipiente esterno impermeabile;
- E = recipiente di raccolta dell'effluente;
- F = diffusore/aeratore;
- G = flussometro (facoltativo).

Figura 2

Dettagli del recipiente di aerazione a vaso poroso di 3 litri



Appendice 3

Condizioni operative per la prova di simulazione con fanghi attivi

Controllo in ciascun gruppo

Attrezzatura

di conferma OCSE
vaso poroso

Funzionamento

singola unità
unità accoppiate
unità non accoppiate

Transinoculazione

nessuna
fango attivo
surnatante

Tempo medio di ritenzione

tre ore
sei ore

Base nutritiva

liquame domestico
liquame sintetico

Inoculo

effluente secondario
composito
fango attivo

Addizione del materiale da esaminare

dall'avviamento
addizione graduale
a formazione del fango avvenuta

Analisi

specificità
COD
DOC

C. 11

BIODEGRADAZIONE

FANGHI ATTIVI: SAGGIO DI INIBIZIONE DELLA RESPIRAZIONE

1. METODO

1.1. Introduzione

Con il metodo qui descritto si valuta l'effetto della sostanza in esame sui microorganismi misurando la velocità di respirazione in determinate condizioni alla presenza di diverse concentrazioni della sostanza stessa.

Il metodo ha lo scopo di fornire un procedimento rapido di «screening» per l'identificazione delle sostanze che possono avere effetti nocivi sugli impianti di trattamento batterico aerobio e per indicare le concentrazioni della sostanza in esame, che non provocano effetti inibitori, da usare nei saggi di biodegradabilità.

Si può fare precedere la prova definitiva da una prova orientativa che consenta di avere delle informazioni sull'intervallo di concentrazioni da usare nel saggio.

Nel programma del saggio vengono inclusi due controlli senza la sostanza da esaminare, da utilizzare uno all'inizio e l'altro alla fine della serie di saggi. Ciascun gruppo di fanghi attivi dovrebbe essere anche controllato con una sostanza di riferimento.

Il presente metodo si applica più facilmente a quelle sostanze che grazie alla loro idrosolubilità ed alla loro bassa volatilità, permangono prevalentemente in acqua.

Per le sostanze che hanno invece una limitata solubilità nei mezzi di trattamento, può non essere possibile determinare la EC₅₀.

Quando la sostanza in esame ha tendenza a disaccoppiare la fosforilazione ossidativa, i risultati basati sull'assunzione di ossigeno possono condurre ad errate conclusioni.

Per eseguire il saggio è utile disporre delle seguenti informazioni:

- idrosolubilità,
- tensione di vapore,
- formula di struttura,
- grado di purezza della sostanza in esame.

Raccomandazione:

i fanghi attivi possono contenere organismi potenzialmente patogeni e dovrebbero perciò essere maneggiati con cautela.

1.2. Definizioni e unità

La velocità di respirazione è il consumo di ossigeno da parte di microorganismi del fango aerobio di acque reflue ed è espresso generalmente in mg di O₂ per mg di fango per ora.

Per calcolare l'effetto inibitorio della sostanza in esame ad una data concentrazione, la velocità di respirazione si esprime come percentuale della media delle velocità di respirazione dei due controlli:

$$\left(1 - \frac{2 R_s}{R_{c_1} + R_{c_2}}\right) \times 100 = \text{percentuale di inibizione}$$

dove:

R_s = velocità di consumo di ossigeno alla concentrazione saggiata della sostanza in esame

R_{c₁} = velocità di consumo di ossigeno nel controllo 1,

R_{c₂} = velocità di consumo di ossigeno nel controllo 2.

EC₅₀ è, in questo metodo, la concentrazione della sostanza in esame alla quale la velocità di respirazione risulta pari al 50% di quella rilevata nel controllo nelle condizioni qui descritte.

1.3. **Sostanze di riferimento**

Per controllare che la sensibilità del fango sia normale si raccomanda di usare come sostanza di riferimento il 3,5-diclorofenolo, noto come inibitore della respirazione, e di sottoporlo a determinazione della EC_{50} in ciascun gruppo di fanghi attivi.

1.4. **Principio del metodo**

La velocità di respirazione di un fango attivo, alimentato con una quantità standard di liquame sintetico, è misurato dopo un tempo di contatto di 30 minuti o/e di 3 ore. Si misura anche la velocità di respirazione dello stesso fango attivo in presenza di diverse concentrazioni della sostanza in esame in condizioni per il resto identiche. L'effetto inibitorio della sostanza in esame ad una data concentrazione è espresso come percentuale delle velocità medie di respirazione dei due controlli. Dalle determinazioni a diverse concentrazioni si calcola un valore della EC_{50} .

1.5. **Criteri di qualità**

I risultati del saggio sono validi se:

- la velocità di respirazione dei controlli differiscono entro il 15 %;
- la EC_{50} (30 minuti e/o 3 ore) del 3,5-diclorofenolo cade nell'intervallo accettato compreso fra 5 e 30 mg/l.

1.6. **Descrizione del metodo**

1.6.1. **Reagenti**

1.6.1.1. **Soluzioni della sostanza in esame**

Le soluzioni della sostanza in esame vengono preparate all'inizio dello studio impiegando una soluzione madre. Se si segue il procedimento di cui sotto, è opportuno che la concentrazione della soluzione madre sia di 0,5 g/l.

1.6.1.2. **Soluzione della sostanza di riferimento**

Si può preparare ad esempio una soluzione di 3,5-diclorofenolo sciogliendone 0,5 g in 10 ml di NaOH 1M, diluendo quindi con acqua distillata sino a circa 30 ml, aggiungendo (mentre si agita) H_2SO_4 0,5M sino al punto di precipitazione incipiente — occorreranno circa 8 ml di H_2SO_4 0,5M — e diluendo infine la miscela con acqua distillata sino al volume di 1 litro. Il pH dovrebbe allora avere un valore compreso fra 7 e 8.

1.6.1.3. **Liquame sintetico**

Una alimentazione di liquame sintetico si ottiene sciogliendo in un litro di acqua le seguenti sostanze nelle quantità precisate:

- 16 g di peptone,
- 11 g di estratto di carne,
- 3 g di urea,
- 0,7 g di NaCl,
- 0,4 g di $CaCl_2 \cdot 2H_2O$,
- 0,2 g di $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,
- 2,8 g di K_2HPO_4 .

Nota 1: Questo liquame sintetico è 100 volte più concentrato di quello descritto in OECD Technical Report, «Metodo proposto per la determinazione della biodegradabilità dei tensioattivi impiegati nei detersivi sintetici» (11 giugno 1976), con l'aggiunta di fosfato acido di potassio.

Nota 2: La soluzione preparata, se non viene utilizzata subito, dovrà essere conservata al buio a temperature comprese tra 0 °C e 4 °C per non oltre una settimana, in condizioni tali da non subire alterazioni nella composizione. Inoltre, prima della conservazione la soluzione potrà essere sterilizzata oppure si potranno aggiungere il peptone e l'estratto di carne solo poco prima di effettuare l'analisi. Prima dell'uso la soluzione dovrà essere agitata ed il suo pH dovrà essere corretto.

1.6.2. **Apparecchiatura**

Apparecchiatura di misurazione: non è importante che l'apparecchio abbia una forma precisa. Comunque, la bottiglia di misurazione dovrebbe essere completamente piena e la sonda dovrebbe aderire ermeticamente al collo.

È necessaria la normale dotazione di laboratorio ed in particolare:

- apparecchio di misurazione,
- sistema di aerazione,
- elettrodo per pH e relativa apparecchiatura di misurazione,
- elettrodo ad ossigeno.

1.6.3. Preparazione dell'inoculo

Come inoculo batterico per il saggio si impiega fango attivo proveniente da un impianto di trattamento di liquami prevalentemente domestici.

Se necessario, al ritorno in laboratorio, si possono rimuovere le particelle grossolane mediante sedimentazione per un breve periodo ad esempio per 15 minuti, e, quindi, decantare, per l'uso, lo strato superficiale contenente le particelle solide più piccole. In alternativa il fango può essere miscelato per pochi secondi con un agitatore.

Inoltre, ove si presume la presenza di materiali inibenti, il fango dovrebbe essere lavato con acqua di rubinetto o con soluzione isotonica. Dopo centrifugazione si decanta il surnatante (questo procedimento si ripete per tre volte).

Una piccola quantità di fango umido viene pesata, essiccata e ripesata. In questo modo si può calcolare la quantità di fango umido da sospendere in acqua per ottenere un fango attivo con una quantità di solidi sospesi nel liquido chiarificato compresa tra 2 e 4 gr/l. Questa quantità dà una concentrazione compresa tra 0,8 e 1,6 g/l nel mezzo utilizzato per il saggio, se si segue la procedura raccomandata più sotto.

Se il fango non può essere utilizzato il giorno stesso del prelievo, ad ogni litro del fango attivo preparato come sopra si aggiungono 50 ml di liquame sintetico; il fango viene quindi aerato per tutta la notte a 20 °C (± 2 °C). L'aerazione viene mantenuta anche durante la giornata in attesa dell'uso prima del quale si controlla e, se necessario, si tampona il pH fra 6 e 8. I solidi sospesi nel liquido chiarificato si dovrebbero determinare come descritto nel precedente paragrafo.

Se si deve impiegare lo stesso gruppo di fanghi nei giorni successivi (quattro giorni al massimo), alla fine di ogni giornata di lavoro occorrerà aggiungere altri 50 ml di liquame sintetico, per litro di fango.

1.6.4. Esecuzione del saggio

Durata/tempo di contatto:	30 minuti e/o 3 ore, sotto aerazione;
Acqua:	acqua potabile (se necessario dechlorata);
Alimentazione di aria:	aria pulita, esente da oli; flusso da 0,5 a 1 l/min;
Apparecchiatura di misurazione:	bottiglia a fondo piatto del tipo della bottiglia per la determinazione del BOD;
Ossimetro:	idoneo elettrodo ad ossigeno con registratore;
Soluzione nutritiva:	liquame sintetico (vedi sopra);
Sostanza in esame:	la soluzione in esame è preparata in concomitanza all'inizio del saggio;
Sostanza di riferimento:	ad esempio 3,5-diclorofenolo (almeno tre concentrazioni);
Controlli:	campioni inoculati esenti dalla sostanza in esame;
Temperatura:	20 °C (± 2 °C).

Si descrive in seguito un procedimento sperimentale che può essere seguito sia per la sostanza in esame che per quella di riferimento durante il periodo di contatto di tre ore.

Occorrono diversi recipienti (ad esempio becher da 1 litro). Si dovrebbe impiegare una serie di almeno cinque concentrazioni che differiscano tra di loro di un fattore costante di preferenza non superiore a 3,2.

Al tempo «0», si portano 16 ml di liquame sintetico a 300 ml con acqua. Si aggiungono 200 ml di inoculo batterico e si versa la miscela totale (500 ml) in un primo recipiente (primo controllo C₁).

I recipienti in esame dovrebbero essere aerati continuamente in modo da impedire che il livello di O₂ disciolto scenda al di sotto di 2,5 ml/l ed in modo che, subito prima di misurare la velocità di respirazione, la concentrazione di O₂ sia almeno uguale a 6,5 mg/l.

Al tempo «15 minuti» (15 minuti è un intervallo arbitrario ma adeguato) si ripete la stessa operazione salvo che 100 ml della soluzione madre della sostanza in esame vengono aggiunti ai 16 ml di liquame sintetico prima di aggiungere l'acqua sino a 300 ml e l'inoculo batterico sino al volume di 500 ml. Questa miscela viene quindi versata in un secondo recipiente ed aerata come sopra. Si ripete questo procedimento ad intervalli di 15 minuti con differenti volumi della soluzione madre della sostanza in esame, in modo da disporre di una serie di recipienti contenenti diverse concentrazioni della sostanza in esame. Infine si prepara un secondo controllo (C₂).

Dopo tre ore si determina il pH e si versa un'aliquota ben miscelata del contenuto del primo recipiente nell'apparecchio di misurazione e si misura la velocità di respirazione per un tempo fino a 10 minuti.

Questa determinazione viene ripetuta sul contenuto di ciascun recipiente ad intervalli di 15 minuti, in modo che il tempo di contatto per ogni recipiente sia di tre ore.

La sostanza di riferimento viene saggiata nello stesso modo su ciascun gruppo di inoculi batterici.

Quando si devono effettuare misurazioni dopo 30 minuti di contatto, occorre un procedimento diverso (ad esempio con più di un ossimetro).

Se si richiede la misura del consumo di ossigeno, si preparano altre bottiglie contenenti la sostanza in esame, il liquame sintetico ed acqua ma non fango attivo.

Il consumo di ossigeno si misura e registra dopo un periodo di aerazione di 30 minuti e/o 3 ore (tempo di contatto).

2. DATI E VALUTAZIONE

La velocità di respirazione si calcola dal tracciato del registratore nell'intervallo che va da circa 2,5 a 6,5 mg O₂/l, oppure, se la velocità di respirazione è bassa, per un periodo di 10 minuti. Il tratto di curva di respirazione in cui si misura la velocità di respirazione dovrebbe essere lineare.

Se le velocità di respirazione dei due controlli differiscono tra loro di più del 15% o se la EC₅₀ (30 minuti e/o 3 ore) della sostanza di riferimento non cade nell'intervallo ammesso (da 5 a 30 mg/l per il 3,3-diclorofenolo), la prova non è valida e deve essere ripetuta.

Per ogni concentrazione in esame si calcola la percentuale di inibizione (vedi paragrafo 1.2). Quest'ultima viene riportata in grafico, su carta lognormale (o logprobit), in funzione della concentrazione e si ricava un valore di EC₅₀.

Usando procedimenti standard si possono determinare i limiti di confidenza al 95% per i valori della EC₅₀.

3. RELAZIONE

3.1. Relazione sul saggio

Nella relazione sul saggio devono figurare, se possibile:

- Sostanza in esame: dati di identificazione chimica.
- Sistema di saggio: origine, concentrazione ed eventuali trattamenti preliminari del fango attivo.
- Condizioni del saggio:
 - pH della miscela in esame prima di determinare la respirazione;
 - temperatura;
 - durata;
 - sostanza di riferimento e relativa EC₅₀ misurata;
 - eventuale assunzione abiotica di ossigeno.
- Risultati:
 - tutti i dati misurati;
 - curva di inibizione e metodo per il calcolo della EC₅₀.
 - EC₅₀ e, se possibile, limiti di confidenza al 95%, EC₂₀ ed EC₈₀.
 - tutte le osservazioni e le eventuali deviazioni dal presente metodo che potrebbero aver condizionato il risultato.

3.2. Interpretazione dei dati

Dal momento che le complesse interazioni che si hanno nell'ambiente non possono essere fedelmente riprodotte in un saggio di laboratorio, il valore della EC₅₀ dovrebbe essere considerato semplicemente come una indicazione della probabile tossicità della sostanza in esame per il fango attivo usato nel trattamento dei liquami o per i microorganismi delle acque reflue.

Inoltre, le sostanze in esame aventi effetto inibitorio sull'ossidazione dell'ammoniaca possono anche causare curve di inibizione atipiche. Di conseguenza tali curve dovranno essere interpretate con cautela.

4.

BIBLIOGRAFIA

- (1) International Standard ISO/8192 — 1986.
 - (2) Broecker, B. e Zahn, R., *Water Research* 11, (1977), pagina 165.
 - (3) Brown, D., Hitz, H. R. e Schaefer, L., *Chemosphere* 10, (1981), pagina 245.
 - (4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries) *Recommended Method N. 103*, descritto anche in:
 - (5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, (1976), pagina 80.
 - (6) Schefer, W., *Textilveredelung* 6, (1977), pagina 247.
 - (7) OCSE, Parigi 1981, *Linea Guida* 209, decisione C(81) 30 def. del Consiglio.
-

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 volabili, 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 (vedi 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 $C_{\text{totale}} - C_{\text{inorganico}}$).

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.

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 del periodo di aerazione (mg/l)

C_f = 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:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \quad [1]$$

dove:

D_{da} = degradazione/aggiunta giornaliera.

2) la rimozione percentuale D_{ssd} di sostanza rispetto a quella presente all'inizio di ogni giorno:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2 a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2C(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2 b)]$$

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.

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 propongono qui sostanze di riferimento specifiche.

Nell'allegato 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 attivi 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 rimuove 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.

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 (vedi 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 riempie 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.

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. I 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 centigradi.

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} , vedi 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 (vedi 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.

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 $^{14}\text{CO}_2$ 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 B*, decisione C(81) 30 def. del Consiglio.

Appendice 1

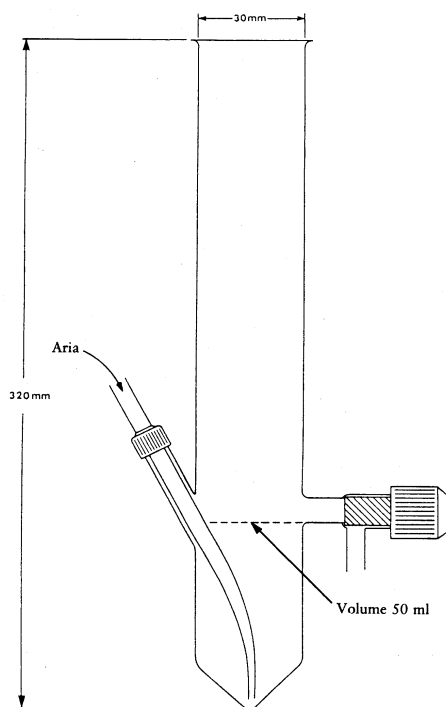
Saggio SCAS: Esempio di risultati

Sostanza	C_T (mg/l)	$C_i - C_c$ (mg/l)	Biodegrada- zione percentuale D_{60}	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

Appendice 2

Esempio di apparecchiatura per il saggio

Figura 1



**C.13 BIOCONCENTRAZIONE:
SAGGIO SUI PESCI, METODO A FLUSSO CONTINUO**

1. METODO

Questo metodo di bioconcentrazione corrisponde al metodo OCSE TG 305 (1996).

1.1 INTRODUZIONE

Il presente metodo descrive una procedura per caratterizzare il potenziale di bioconcentrazione di una sostanza nei pesci in condizioni di flusso continuo. Benchè i regimi di saggio a flusso continuo siano ampiamente preferibili, sono ammissibili regimi semistatici, purchè siano soddisfatti i criteri di validità.

Il metodo fornisce dettagli sufficienti per eseguire il saggio concedendo una libertà adeguata per adattare l'impianto sperimentale alle particolari condizioni di laboratorio e alla variabilità delle caratteristiche delle sostanze analizzate. La sua validità è massima per composti chimici organici stabili con $\log P_{oa}$ compreso tra 1,5 e 6,0 (1), ma è applicabile anche a sostanze superlipofile ($\log P_{oa} > 6,0$). La stima preliminare del fattore di bioconcentrazione (BCF), indicato talvolta con K_B , per tali sostanze superlipofile sarà presumibilmente più elevata del fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario (BCF_{ss}) prevedibilmente ottenuto da esperimenti di laboratorio. Stime preliminari del fattore di bioconcentrazione per composti chimici organici con valori di $\log P_{oa}$ fino a circa 9,0 si possono ricavare dall'equazione di Bintein et al (2). I parametri che caratterizzano il potenziale di bioconcentrazione includono la costante di velocità di assorbimento (k_1), la costante di velocità di depurazione (k_2) e il BCF_{ss} .

L'analisi dei campioni acqua e di pesce può risultare più facile se le sostanze in esame sono radiomarcate; e queste possono venire utilizzate per determinare se sia il caso di procedere all'identificazione e alla quantificazione dei prodotti di degradazione. Se si misurano i residui radioattivi totali (p.es. per combustione o solubilizzazione dei tessuti), il BCF risulta basato sul composto progenitore, eventuali metaboliti trattenuti e anche sul carbonio assimilato. I BCF basati sui residui radioattivi totali non sono pertanto confrontabili direttamente con un BCF ottenuto mediante analisi chimica specifica del solo composto progenitore.

Negli studi con radiomarcante si possono impiegare procedure di bonifica per determinare il BCF sulla base del composto progenitore, e se ritenuto necessario si possono caratterizzare i principali metaboliti. E' anche possibile combinare uno studio di metabolismo nei pesci con uno studio di bioconcentrazione mediante l'analisi e l'identificazione dei residui nei tessuti.

1.2 DEFINIZIONI E UNITA'

Bioconcentrazione/Bioaccumulo è l'aumento di concentrazione della sostanza in esame in o su un organismo (suoi tessuti specificati) rispetto alla concentrazione della sostanza in esame nell'ambiente circostante.

Il fattore di bioconcentrazione (BCF o K_B) in qualsiasi momento durante la 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 $\mu\text{g/g}$ (ppm)) divisa per la concentrazione del composto chimico nell'ambiente circostante (C_w in $\mu\text{g/ml}$ (ppm)).

Il fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario (BCF_{ss} o K_B) non cambia in modo significativo su un periodo di tempo prolungato, la concentrazione della sostanza in esame nell'ambiente circostante essendo costante durante tale periodo di tempo.

Un livello costante o stato stazionario nel tracciato della sostanza in esame nei pesci (C_f) contro il tempo 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 differiscono di non oltre il $\pm 20\%$ una dall'altra, e non vi sono differenze significative tra i tre periodi di campionamento. 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.

Fattori di bioconcentrazione calcolati direttamente dalle costanti di velocità cinetiche (k_1/k_2) sono definiti fattore di concentrazione cinetico, BCF_K .

Il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (P_{oa}) è il rapporto della solubilità di un composto chimico in n-ottanolo su quella in acqua all'equilibrio (metodo A.8), espresso anche come K_{oa} . Il logaritmo di P_{oa} viene usato come indicazione del potenziale di bioconcentrazione di un composto chimico da parte di organismi acquatici.

La fase di esposizione o assorbimento è il tempo durante il quale i pesci sono esposti al composto chimico in esame.

La costante di velocità 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 composto chimico (k_1 è espresso in giorni^{-1}).

La fase post-esposizione o di depurazione (perdita) è il tempo, dopo il trasferimento del pesce di prova da un ambiente contenente la sostanza in esame ad un ambiente esente da tale sostanza, durante il quale viene studiata la depurazione (o perdita netta) della sostanza dal pesce di prova (o suo tessuto specificato).

La costante di velocità 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 da un ambiente contenente la sostanza in esame ad un ambiente esente da tale sostanza (k_2 è espresso in giorni^{-1}).

1.3 PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

Il saggio è costituito da due fasi: la fase di esposizione (assorbimento) e di post-esposizione (depurazione). Durante la fase di assorbimento, gruppi separati di pesci di una stessa specie vengono esposti ad almeno due concentrazioni della sostanza in esame. Essi vengono poi trasferiti in un ambiente esente dalla sostanza in esame per la fase di depurazione. E' sempre necessaria una fase di depurazione salvo che l'assorbimento della sostanza durante la fase di assorbimento sia risultato insignificante (p.es. BCF minore di 10). La concentrazione della sostanza in esame nel o sul pesce (o suo tessuto specificato) viene seguita in tutte e due le fasi della prova. In aggiunta alle due concentrazioni di prova, un gruppo di pesci di controllo viene mantenuto in condizioni identiche, salvo per l'assenza della sostanza in esame, per confrontare possibili effetti dannosi osservati nel saggio di bioconcentrazione con un gruppo di controllo corrispondente e per ottenere concentrazioni di fondo della sostanza in esame.

La fase di assorbimento viene eseguita per 28 giorni salvo dimostrazione che l'equilibrio è stato raggiunto prima. Per una previsione della durata della fase di assorbimento e del tempo necessario per arrivare allo stato stazionario ci si può basare sull'equazione fornita nell'allegato 3. Viene poi iniziato il periodo di depurazione trasferendo il pesce in un altro contenitore pulito con lo stesso ambiente ma senza la sostanza in esame. Se possibile, il fattore di bioconcentrazione viene calcolato preferibilmente sia come rapporto (BCF_{ss}) delle concentrazioni nel pesce (C_f) e nell'acqua (C_w) nello stato stazionario apparente che come fattore di bioconcentrazione cinetico, BCF_K , che è il rapporto fra le costanti di velocità di assorbimento (k_1) e di depurazione (k_2) assumendo una cinetica di primo ordine. Se appare ovvio che la cinetica seguita non è di primo ordine, impiegare modelli più complessi (allegato 5).

Se lo stato stazionario non viene raggiunto entro 28 giorni, la fase di assorbimento deve essere prolungata fino al raggiungimento dello stato stazionario, con un limite massimo di 60 giorni, dopo di che si incomincia la fase di depurazione.

La costante di velocità di assorbimento, la costante di velocità di depurazione (perdita) (o le costanti nel caso di modelli più complessi), il fattore di bioconcentrazione e, se possibile, i limiti 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.

Il BCF è espresso in funzione del peso umido totale del pesce. 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 tessuti od organi specificati (p.es. muscolo, fegato). Poichè per molte sostanze organiche esiste una chiara relazione tra il potenziale di bioconcentrazione e la lipofilia, esiste anche una relazione corrispondente tra il contenuto di lipidi nel pesce di prova e la bioconcentrazione osservata di tali sostanze. Pertanto, allo scopo di ridurre questa fonte di variabilità nei risultati sperimentali per le sostanze di elevata lipofilia (cioè con $\log P_{oa} > 3$), la bioconcentrazione dovrebbe essere espressa in relazione al contenuto di lipidi oltre che al peso corporeo totale.

Il contenuto di lipidi deve essere determinato possibilmente sullo stesso materiale biologico usato per determinare la concentrazione della sostanza in esame.

1.4 INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

Prima di eseguire la prova di bioconcentrazione si dovrebbero conoscere le seguenti informazioni sulla sostanza in esame:

- a) solubilità in acqua
- b) coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua P_{oa} (indicato anche con K_{oa} , determinato mediante HPLC in A.8)
- c) idrolisi
- d) fototrasformazione in acqua, determinata sotto irraggiamento solare o solare simulato e nelle condizioni di irraggiamento della prova di bioconcentrazione (3)
- e) tensione superficiale (per sostanze per le quali non è possibile determinare il $\log P_{oa}$)
- f) tensione di vapore
- g) pronta biodegradabilità (se del caso)

Un'altra informazione richiesta è la tossicità nei confronti delle specie ittiche usate nel saggio, preferibilmente la CL_{50} asintotica (cioè indipendente dal tempo). Per la quantificazione della sostanza in esame nelle soluzioni di saggio e nel materiale biologico, oltre ai dettagli relativi alla preparazione e conservazione del campione è necessario disporre di un metodo analitico appropriato, di accuratezza, precisione e sensibilità note. Dovrebbe essere noto anche il limite di rivelazione analitica in acqua e nei tessuti del pesce della sostanza in esame. Quando per l'esame si utilizza una sostanza marcata con ^{14}C è necessario conoscere la percentuale di radioattività associata ad impurezze.

1.5 VALIDITA' DEL SAGGIO

Perché il saggio sia valido occorre rispettare le seguenti condizioni:

- le variazioni di temperatura devono essere minori di $\pm 2^{\circ}C$;
- la concentrazione dell'ossigeno disciolto non deve scendere al di sotto del 60% della saturazione;
- la concentrazione della sostanza in esame nelle camere deve venire mantenuta entro $\pm 20\%$ della media dei valori misurati durante la fase di assorbimento;
- la mortalità o altri effetti dannosi o malattie sia nei pesci di controllo che in quelli trattati devono essere minori del 10% al termine della prova. Quando la prova viene prolungata a varie settimane o mesi, il tasso di mortalità o altri effetti dannosi in tutte e due le serie di pesci deve essere minore del 5% al mese e non superare il 30% in totale.

1.6 COMPOSTI DI RIFERIMENTO

Per verificare la procedura sperimentale, laddove richiesto, può servire l'uso di composti di riferimento di potenziale di bioconcentrazione noto. Tuttavia per ora non è possibile raccomandare sostanze specifiche.

1.7 DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

1.7.1 Apparecchiatura

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 sul pesce. Si possono usare vasche rettangolari o cilindriche normali di materiale chimicamente inerte e di capacità adeguata al tasso di carico. Minimizzare l'uso di tubature in materia plastica flessibile. Usare di preferenza tubature di Teflon (R), acciaio inossidabile e/o vetro. L'esperienza ha dimostrato che per sostanze con elevati coefficienti di adsorbimento come i piretroidi sintetici può essere necessario il vetro silanizzato. In queste situazioni le apparecchiature non possono venire riutilizzate.

1.7.2 **Acqua**

Nel saggio si usa in genere acqua naturale che dovrebbe essere prelevata da una fonte non contaminata e di qualità uniforme. L'acqua di diluizione 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 mostrino alcun aspetto o comportamento anomalo. L'ideale sarebbe dimostrare che la specie in esame è in grado di sopravvivere, crescere e riprodursi nell'acqua di diluizione (p.es. in una coltura di laboratorio o in un saggio di tossicità su tutto il ciclo di vita). L'acqua deve essere caratterizzata almeno con il pH, la durezza, i solidi totali, il carbonio organico totale e di preferenza anche ammonio, nitriti e alcalinità nonchè, per le specie marine, la salinità. I parametri importanti per il benessere ottimale dei pesci sono perfettamente noti, ma l'allegato I fornisce concentrazioni massime raccomandate per un certo numero di parametri per le acque dolci e marine usate nel saggio.

L'acqua dovrebbe essere di qualità costante per tutta la durata di un saggio. Il pH dovrebbe essere compreso tra 6,0 e 8,5, ma durante un dato saggio deve restare entro $\pm 0,5$ unità di pH. Per assicurarsi che l'acqua di diluizione non abbia influenze indesiderate sul risultato sperimentale (p.es. per complessazione della sostanza in esame) o influisca dannosamente sul pesce, prelevare di quando in quando dei campioni per l'analisi. La determinazione dei metalli pesanti (p.es. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), dei principali anioni e cationi (p.es. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO₄), dei pesticidi (p.es. pesticidi organofosforati totali e organoclorurati totali), del carbonio organico totale e dei solidi in sospensione deve essere effettuata per esempio ogni 3 mesi ove si sappia che l'acqua di diluizione è di qualità relativamente costante. Se la qualità dell'acqua si è dimostrata costante per almeno un anno, le determinazioni possono essere effettuate con minore frequenza, a intervalli più lunghi (p.es. ogni sei mesi).

Il contenuto naturale di particelle in sospensione nonchè il carbonio organico totale (TOC) nell'acqua di diluizione devono essere i più bassi possibili per evitare un adsorbimento della sostanza in esame su materia organica che ne può ridurre la biodisponibilità (4). Il valore massimo accettabile è di 5 mg/l per i solidi sospesi (materia secca che non passa attraverso un filtro da 0,45 µm) e di 2 mg/l per il carbonio organico totale (vedi Allegato 1). Se necessario, filtrare l'acqua prima dell'uso. Il contributo del pesce di prova al contenuto di carbonio organico nell'acqua (escrezioni) e quello dei residui alimentari deve essere il più basso possibile. Durante tutto il saggio, la concentrazione del carbonio organico nel recipiente di esecuzione del saggio non deve superare la concentrazione di carbonio organico derivata dalla sostanza in esame e dall'eventuale agente solubilizzante più 10 mg/l ($\pm 20\%$).

1.7.3 **Soluzioni di saggio**

Preparare una soluzione madre ("stock") della sostanza in esame a una concentrazione adatta. La soluzione madre deve essere preparata preferibilmente per semplice miscelazione o agitazione della sostanza in esame nell'acqua di diluizione. E' preferibile non usare solventi o disperdenti (agenti solubilizzanti); può tuttavia essere opportuno in alcuni casi per produrre una soluzione madre di concentrazione adatta. Solventi che si possono usare sono etanolo, metanolo, etere monometilico 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. Prestare attenzione quando si usano agenti prontamente biodegradabili perchè possono causare problemi di crescita batterica nelle prove a flusso continuo. La sostanza in esame può essere radiomarcata e dovrebbe avere la massima purezza (preferibilmente $>98\%$).

Per le prove a flusso continuo occorre un sistema che eroghi e diluisca in continuo una soluzione madre della sostanza in esame (p.es. pompa dosatrice, diluatore proporzionale, sistema di saturazione) per fornire le concentrazioni di prova nelle camere di saggio. Il volume di ciascuna camera di saggio deve essere sostituito preferibilmente almeno cinque volte al giorno. La modalità a flusso continuo va preferita, ma laddove non sia possibile (p.es. quando ciò ha un'influenza dannosa sugli organismi in esame) si può utilizzare una tecnica semistatica, purchè siano rispettati i criteri di validità. Le portate di soluzione madre e acqua di diluizione devono essere controllate 48 ore prima del saggio e poi almeno una volta al giorno durante il saggio. In questo controllo deve essere inclusa la determinazione della portata attraverso ciascuna camera di saggio e si deve garantire che questa vari non più del 20% all'interno di ciascuna camera e tra una camera e l'altra.

1.7.4 **Scelta delle specie**

Criteri importanti nella scelta delle specie sono la disponibilità, la possibilità di ottenerle di dimensioni convenienti e di mantenerle in modo soddisfacente in laboratorio. Altri criteri per la scelta delle specie ittiche includono l'importanza ricreativa, commerciale ed ecologica nonchè una sensibilità paragonabile, il fatto che essa sia stata già utilizzata con successo in passato, ecc.

Specie sperimentali raccomandate sono indicate nell'Allegato 2. Si possono usare anche altre specie, ma può darsi che la procedura di saggio debba venire adattata per ottenere condizioni sperimentali idonee. In questo caso, la relazione deve indicare la ragione della scelta della specie e il metodo di saggio.

1.7.5 Stabulazione del pesce

Acclimatare la popolazione ittica di scorta per almeno due settimane in acqua alla temperatura di saggio e alimentarla con mangime dello stesso tipo usato durante il saggio in quantità sufficiente.

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'intera partita viene respinta;
- mortalità tra il 5 e il 10% della popolazione in sette giorni: l'acclimatazione prosegue per altri sette giorni;
- mortalità minore del 5% della popolazione in sette giorni: la partita è accettabile - in caso di mortalità superiore al 5% durante il secondo periodo di sette giorni l'intera partita viene respinta.

Assicurarsi che i pesci usati nelle prove non presentino malattie o anomalie osservabili. Scartare qualsiasi pesce ammalato. Nelle due settimane che precedono il saggio e durante il saggio i pesci non devono ricevere alcun trattamento per la cura di malattie.

1.8 ESECUZIONE DEL SAGGIO

1.8.1 Saggio preliminare

Può essere utile condurre un esperimento preliminare allo scopo di ottimizzare le condizioni sperimentali del test definitivo, per esempio la scelta delle concentrazioni della sostanza in esame e la durata delle fasi di assorbimento e di depurazione.

1.8.2 Condizioni di esposizione

1.8.2.1 Durata della fase di assorbimento

La durata prevedibile della fase di assorbimento si può ricavare dall'esperienza pratica (p.es. da uno studio precedente o da un composto chimico con accumulo simile) o da certe relazioni empiriche conoscendo la solubilità in acqua o il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua della sostanza in esame (vedi Allegato 3).

La fase di assorbimento deve durare 28 giorni salvo dimostrazione che l'equilibrio è stato raggiunto prima. Se in 28 giorni non si raggiunge lo stato stazionario, prolungare la fase di assorbimento effettuando ulteriori misure, fino al raggiungimento dello stato stazionario, con un massimo di 60 giorni.

1.8.2.2 Durata della fase di depurazione

Un periodo pari a metà della durata della fase di assorbimento è solitamente sufficiente per una riduzione appropriata (p.es. del 95%) del carico della sostanza nel corpo (vedi Allegato 3 per una spiegazione della stima). Se il tempo necessario per raggiungere una perdita del 95% è troppo lungo nella pratica, per esempio se supera il doppio della normale durata della fase di assorbimento (cioè oltre 56 giorni), si può utilizzare un periodo più breve (fino ad una riduzione della concentrazione della sostanza in esame al di sotto del 10% della concentrazione nello stato stazionario). Tuttavia, per sostanze con caratteristiche di assorbimento e depurazione più complesse di quelle rappresentate da un modello ittico a compartimento singolo, che fornisce una cinetica di primo ordine, prevedere fasi di depurazione più lunghe per la determinazione delle costanti di velocità di perdita. Il periodo può tuttavia dipendere dal tempo durante il quale la concentrazione della sostanza in esame nel pesce rimane al di sopra del limite analitico di rivelazione.

1.8.2.3 Numero di pesci di prova

Scegliere il numero di pesci per ogni concentrazione di prova in modo tale che ad ogni campionamento siano disponibili almeno quattro pesci per campione. Se si richiede una potenza statistica più elevata, sarà necessario un maggior numero di pesci per campione.

Se si usano pesci adulti, indicare nella relazione se l'esperimento viene effettuato con maschi o femmine o ambedue. Se si utilizzano tutti e due i sessi, prima di incominciare l'esposizione documentare che le differenze di contenuto di lipidi tra i sessi non siano significative; può essere necessario raggruppare tutti i maschi e tutte le femmine.

In ogni saggio scegliere pesci di peso simile, tale che il più piccolo abbia un peso non inferiore a due terzi del più grande. I pesci dovrebbero essere tutti della stessa classe di età e provenire dalla stessa fonte. Poiché il peso e l'età di un pesce sembrano talvolta avere un effetto significativo sui valori di BCF (1), riportare accuratamente questi dettagli nella relazione. Si raccomanda di pesare un sottocampione dello stock di pesci prima del saggio per stimare il peso medio.

1.8.2.4 *Carico*

Usare rapporti acqua su pesce elevati per minimizzare la riduzione di C_w causata dall'aggiunta del pesce all'inizio del saggio e per evitare riduzioni della concentrazione di ossigeno disciolto. È importante che il carico sia appropriato per la specie usata nel saggio. In ogni caso si raccomanda normalmente un carico di 0,1-1,0 g di pesce (peso umido) per litro d'acqua per giorno. Si possono utilizzare carichi elevati se si dimostra che la concentrazione della sostanza in esame può venire mantenuta entro i limiti di $\pm 20\%$ del valore richiesto, e che la concentrazione dell'ossigeno disciolto non scende al di sotto del 60% della saturazione.

Nella scelta di appropriati regimi di carico si deve tener conto dell'habitat normale della specie ittica. Per esempio, pesci che vivono sul fondo, a pari volume d'acqua, possono richiedere un acquario con area di fondo più grande rispetto alle specie ittiche pelagiche.

1.8.2.5 *Alimentazione*

Durante i periodi di acclimatazione e di saggio, mantenere i pesci ad un regime alimentare appropriato, avente un contenuto di lipidi e di proteine totali noto, in quantità sufficiente per tenerli in condizioni di buona salute e per mantenere il peso corporeo. Per tutto il periodo di acclimatazione e di prova somministrare ai pesci il cibo in una quantità approssimativamente dall'1 al 2% del peso corporeo al giorno; nella maggior parte delle specie ittiche questo regime mantiene la concentrazione dei lipidi ad un livello relativamente costante durante il saggio. La quantità di mangime deve venire ricalcolata, 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 camera di saggio in base al peso del pesce campionato più recentemente nella stessa camera. Non pesare i pesci rimasti nella camera.

Cibo non consumato e feci vengono sifonati giornalmente dalle camere di saggio poco dopo la fornitura del cibo (da 30 minuti a 1 ora). Mantenere le camere più pulite possibile per tutto il saggio in modo che la concentrazione di materia organica rimanga più scarsa possibile perché la presenza di carbonio organico può limitare la biodisponibilità della sostanza in esame (1).

Poiché molti mangimi derivano da farina di pesce, analizzare il contenuto della sostanza in esame nel mangime. È desiderabile analizzare nel mangime anche il contenuto di pesticidi e metalli pesanti.

1.8.2.6 *Luce e temperatura*

Il fotoperiodo è normalmente da 12 a 16 ore e la temperatura ($\pm 2^\circ\text{C}$) dovrebbe essere appropriata per la specie di prova (vedi Allegato 2). Il tipo e le caratteristiche dell'illuminazione devono essere noti. Fare attenzione ad una possibile fototrasformazione della sostanza in esame nelle condizioni di irraggiamento dello studio. Usare un'illuminazione appropriata evitando l'esposizione del pesce a fotoprodotto non naturali. In alcuni casi può essere appropriato utilizzare un filtro per bloccare la radiazione UV al di sotto di 290 nm.

1.8.2.7 *Concentrazioni di prova*

I pesci vengono esposti in condizioni di flusso continuo ad almeno due concentrazioni della sostanza in esame in acqua. Normalmente la concentrazione più elevata (o massima) della sostanza in esame viene scelta intorno all'1% della sua CL_{50} asintotica acuta e almeno dieci volte più elevata del suo limite di rivelazione in acqua mediante il metodo analitico usato.

La concentrazione di prova massima può venire determinata anche dividendo la CL_{50} acuta a 96 ore per un appropriato rapporto acuta/cronica (rapporti appropriati per alcuni composti chimici possono essere da circa 3 fino a 100). Se possibile, scegliere l'altra o le altre concentrazioni in modo che differiscano dalla suddetta di un fattore 10. Se ciò non è possibile perché il limite analitico urta con il criterio dell'1% della CL_{50} , si può usare un fattore minore di 10, altrimenti prendere in considerazione la marcatura con ^{14}C della sostanza in esame. Non usare mai una concentrazione superiore alla solubilità della sostanza in esame.

Se si usa un agente solubilizzante, la sua concentrazione non dovrebbe essere superiore a 0,1 ml/l, e deve essere uguale in tutte le vasche di saggio. Il suo contributo, insieme con la sostanza in esame, al contenuto complessivo di carbonio organico nell'acqua usata per il saggio deve essere noto. Fare comunque il possibile per evitare l'uso di tali materiali.

1.8.2.8 *Prove di controllo*

Oltre alla serie dei saggi, eseguire una prova di controllo con l'acqua di diluizione o, se del caso, una prova con acqua contenente l'agente solubilizzante, posto che sia stato stabilito che l'agente non ha effetti sul pesce; altrimenti eseguire tutte e due le prove di controllo.

1.8.3 **Frequenza delle misure della qualità dell'acqua**

Durante il saggio, misurare in tutte le vasche ossigeno disciolto, TOC, pH e temperatura. La durezza totale e la salinità, se del caso, devono essere misurate nelle prove di controllo e in una vasca 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 giornalmente, il pH all'inizio e al termine di ciascun periodo e la durezza una volta per ogni saggio. La temperatura dovrebbe preferibilmente essere controllata in continuo in almeno una vasca.

1.8.4 **Campionamento e analisi dei pesci e dell'acqua**

1.8.4.1 *Programma di campionamento del pesce e dell'acqua*

Per la determinazione della concentrazione della sostanza in esame, l'acqua delle camere di saggio viene campionata prima dell'aggiunta del pesce e durante le fasi di assorbimento e depurazione. Campionare l'acqua come minimo tutte le volte che viene campionato il pesce e prima della fornitura del mangime. Durante la fase di assorbimento, determinare le concentrazioni della sostanza in esame per verificare il rispetto dei criteri di validità.

I pesci vengono campionati almeno cinque volte durante la fase di assorbimento e almeno quattro volte durante la fase di depurazione. 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 (vedi allegato 4). I campioni in più vengono conservati e analizzati solo se i risultati della prima serie di analisi si dimostrano inadeguati per il calcolo del BCF con la precisione desiderata.

L'Allegato 4 presenta un esempio di un programma di campionamento accettabile. Se si usano altri valori di P_{oa} per calcolare il tempo di esposizione necessario per un assorbimento del 95%, si possono facilmente calcolare altri programmi.

Il campionamento viene continuato durante la fase di assorbimento fino a quando si stabilisce lo stato stazionario, con un limite massimo di 28 giorni. Se non si raggiunge lo stato stazionario in 28 giorni, il campionamento continua fino al raggiungimento dello stato stazionario, con un massimo di 60 giorni. Prima dell'inizio della fase di depurazione, i pesci vengono trasferiti in vasche pulite.

1.8.4.2 *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 camera di saggio. Poiché sembra che né la filtrazione né la centrifugazione separino sempre la frazione non-biodisponibile della sostanza in esame da quella biodisponibile (in particolare per composti chimici super-lipofili, cioè quelli con un $\log P_{oa} > 5$) (1) (5), i campioni non devono essere sottoposti a questi trattamenti.

Curare, invece, di mantenere le vasche più pulite possibile e controllare il contenuto di carbonio organico totale durante le fasi di assorbimento e depurazione.

Ad ogni campionamento rimuovere dalle camere di saggio un numero appropriato di pesci (normalmente almeno quattro). I pesci campionati vengono rapidamente risciacquati con acqua, "asciugati" per tamponamento, uccisi immediatamente con l'uso del metodo più appropriato e umano e poi pesati.

E' preferibile analizzare il pesce e l'acqua immediatamente dopo il campionamento allo scopo di evitare degradazione o altre perdite e calcolare tassi approssimativi di assorbimento e depurazione nel corso del saggio. L'analisi immediata evita inoltre ritardi nella determinazione del raggiungimento di un livello costante.

In mancanza di analisi immediata, conservare i campioni mediante un metodo appropriato. Prima di iniziare lo studio procurarsi le informazioni sul metodo appropriato di conservazione per la particolare sostanza in esame - per esempio surgelazione, mantenimento a 4°C, durata della conservazione, estrazione, ecc.

1.8.4.3 *Qualità del metodo analitico*

Poichè 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 la precisione e la riproducibilità dell'analisi chimica, e che il recupero della sostanza in esame dall'acqua e dal pesce, siano soddisfacenti per quel particolare metodo. Inoltre, controllare che la sostanza in esame non sia rilevabile nell'acqua di diluizione usata.

Se necessario, correggere i valori di C_w e C_f ottenuti nel saggio per tener conto del livello di recupero e dei valori di fondo delle prove di controllo. Manipolare sempre i campioni di pesce e acqua in modo da minimizzare la contaminazione e le perdite (p.es. per adsorbimento sul dispositivo di campionamento).

1.8.4.4 *Analisi del campione di pesce*

Se nel saggio vengono usati materiali radiomarcanti, è possibile analizzare il radiomarcante totale (cioè progenitore e metaboliti), oppure i campioni possono venire depurati, così da poter analizzare il composto progenitore separatamente. Inoltre si possono caratterizzare i principali metaboliti allo stato stazionario, oppure al termine della fase di assorbimento se viene conclusa prima del raggiungimento dello stato stazionario. Se il BCF, in termini di residui radiomarcanti totali, è $\geq 1000\%$, può essere consigliabile, e per alcune categorie di composti chimici come i pesticidi è fortemente raccomandato, identificare e quantificare i composti di degradazione che rappresentano $\geq 10\%$ dei residui totali nei tessuti del pesce allo stato stazionario. Se si identificano e quantificano i prodotti di degradazione che rappresentano $\geq 10\%$ dei residui radiomarcanti totali nei tessuti del pesce, si raccomanda di identificarli e quantificarli anche nell'acqua di prova.

La concentrazione della sostanza in esame viene di solito determinata su ciascun singolo pesce pesato. Se ciò non è possibile, si possono raggruppare i campioni in occasione di ciascun campionamento, ma questo limita le procedure statistiche applicabili ai dati. Se si dà importanza ad una specifica procedura statistica e alla sua potenza, nel saggio va incluso un numero di pesci adeguato per tener conto della procedura di raggruppamento e della potenza desiderate (6) (7).

Il BCF va espresso sia in funzione del peso umido totale che, per le sostanze fortemente lipofile, in funzione del contenuto di lipidi. Determinare se possibile il contenuto di lipidi nel pesce ad ogni campionamento. Per la determinazione del contenuto lipidico utilizzare metodi adatti (rif. 8 e 2 dell'Allegato 3). Come metodo standard si può raccomandare la tecnica di estrazione con cloroformio/metanolo (9). I vari metodi non forniscono valori identici (10), per cui è importante indicare in dettaglio il metodo usato. Se possibile l'analisi dei lipidi deve essere effettuata sullo stesso estratto prodotto per l'analisi della sostanza in esame perchè i lipidi devono spesso venire rimossi dall'estratto prima di poterlo analizzare per via cromatografica. La differenza del contenuto di lipidi del pesce (in mg/kg di peso umido) tra l'inizio e il termine dell'esperimento non deve essere superiore a $\pm 25\%$. Registrare anche i solidi percentuali del tessuto per poter convertire la concentrazione lipidica da base umida a base secca.

2. DATI

2.1 TRATTAMENTO DEI RISULTATI

La curva di assorbimento della sostanza in esame viene ottenuta riportando la sua concentrazione nel/sul pesce (o tessuti specificati) durante la fase di assorbimento contro il tempo su scale aritmetiche. Se la curva ha raggiunto un andamento costante, cioè è diventata approssimativamente asintotica all'asse del tempo, il BCF_{ss} allo stato stazionario si calcola da:

$$\frac{C_f \text{ stato.stazionario(media)}}{C_w \text{ stato.stazionario(media)}}$$

Quando non si raggiunge lo stato stazionario si può calcolare un BCF_{ss} di sufficiente precisione per una valutazione di rischio da uno "stato stazionario" all' 80% (1,6/k₂) o al 95% (3,0/k₂) dell'equilibrio.

Determinare inoltre il fattore di concentrazione (BCF_K) come rapporto k₁/k₂, cioè delle due costanti cinetiche di primo ordine. La costante di velocità di depurazione (k₂) viene di solito determinata dalla curva di depurazione (cioè da una curva di riduzione della concentrazione della sostanza in esame nel pesce contro il tempo). La costante di velocità di assorbimento (k₁) viene poi calcolata sulla base di k₂ e di un valore di C_f che si ottiene dalla curva di assorbimento (vedi anche Allegato 5). Il metodo preferito per l'ottenimento del BCF_K e delle costanti di velocità k₁ e k₂, consiste nell'uso di metodi di stima parametrica non lineare su computer (11). Altrimenti per calcolare k₁ e k₂ si possono usare metodi grafici. Se è evidente che la curva di depurazione non è di primo ordine, bisogna allora impiegare modelli più complessi (vedi bibliografia dell'Allegato 3) con l'assistenza di un biostatistico.

2.2 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Se le concentrazioni misurate delle soluzioni di prova sono prossime al limite di rivelazione del metodo analitico, i risultati devono essere interpretati con cautela.

Curve di assorbimento e di perdita chiaramente definite sono un'indicazione di buona qualità dei dati di bioconcentrazione. La variazione delle costanti di assorbimento/depurazione tra le due concentrazioni di prova deve essere minore del 20%. Se si osservano differenze significative nelle velocità di assorbimento/depurazione tra le due concentrazioni di prova applicate, registrarle e fornire una possibile spiegazione. In genere, il limite di confidenza di BCF ottenuti da studi ben impostati è vicino al ± 20%.

3. RELAZIONE

La relazione sulla prova deve includere le seguenti informazioni:

3.1 SOSTANZA DI PROVA:

- natura fisica e, se del caso, proprietà chimico fisiche;
- dati di identificazione chimica (incluso, se opportuno, il contenuto di carbonio organico);
- se radiomarcata, la posizione precisa dell'atomo o degli atomi marcati e la percentuale di radioattività associata ad impurezze;

3.2 SPECIE USATA NEL SAGGIO:

- nome scientifico, ceppo, provenienza, eventuali pretrattamenti, acclimatazione, età, intervallo di dimensioni, ecc.

3.3 CONDIZIONI SPERIMENTALI:

- procedura di saggio usata (p.es. a flusso continuo o semistatica);
- tipo e caratteristiche dell'illuminazione usata e fotoperiodo(i);

- impostazione della prova (p.es. numero e dimensioni delle camere di saggio, tasso di sostituzione del volume d'acqua, molteplicità dei campioni, 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);
- metodo di preparazione delle soluzioni madre e frequenza di rinnovo (se usato, indicare l'agente solubilizzante, la sua concentrazione e il suo contributo al contenuto di carbonio organico dell'acqua);
- concentrazioni nominali nel saggio, medie dei valori misurati e loro deviazioni standard nelle vasche di saggio, e metodo mediante cui sono stati ottenuti questi valori;
- fonte dell'acqua di diluizione, descrizione degli eventuali pretrattamenti, risultati di eventuali dimostrazioni della capacità del pesce di saggio di vivere nell'acqua, e caratteristiche dell'acqua: pH, durezza, temperatura, concentrazione di ossigeno disciolto, livelli residui di cloro (se misurati), carbonio organico totale, solidi sospesi, salinità dell'ambiente di prova (se del caso) ed eventuali altre misure effettuate;
- qualità dell'acqua all'interno delle vasche di saggio, pH, durezza, TOC, temperatura e concentrazione dell'ossigeno disciolto;
- informazioni dettagliate sull'alimentazione (p.es. tipo di mangime, fonte, composizione - se possibile almeno il tenore lipidico e proteico, 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 (se misurato).

3.4

RISULTATI:

- risultati di eventuali studi preliminari eseguiti;
- mortalità dei pesci di controllo e dei pesci in ciascuna camera di esposizione ed eventuale comportamento anomalo osservato;
- contenuto di lipidi del pesce (se determinato durante l'esecuzione delle prove);
- curve (con tutti i dati di misura) di assorbimento e di depurazione del composto chimico in esame nel pesce, tempo di raggiungimento dello stato stazionario;
- C_f e C_w (con deviazione standard e intervallo, se del caso) per tutti i momenti di campionamento (C_f espresso in $\mu\text{g/g}$ di peso umido (ppm) del corpo intero o dei suoi tessuti specificati, per esempio lipidi, e C_w in $\mu\text{g/ml}$ (ppm). Valori di C_w per la serie di controllo (riportare anche il valore di fondo);
- fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario (BCF_{ss}) e/o fattore di concentrazione cinetico (BCF_K) e, se del caso, limiti di confidenza al 95% per le costanti di velocità di assorbimento e depurazione (perdita) (tutte espresse in relazione al corpo intero e al contenuto totale di lipidi, se misurato, dell'animale o di suoi tessuti specificati), limiti di confidenza e deviazione standard (se disponibili) e metodi di calcolo o analisi dei dati per ciascuna concentrazione della sostanza in esame usata;
- se vengono usate sostanze radio-marcate, e se richiesto, si può presentare l'accumulo di tutti i metaboliti rilevati;
- qualsiasi cosa insolita riguardo al saggio, eventuali deviazioni da queste procedure e qualsiasi altra informazione pertinente.

Minimizzare i risultati come "non rilevato a questo limite di rivelazione" mediante lo sviluppo pre-test del metodo e l'impostazione sperimentale perchè tali risultati non possono venire utilizzati per i calcoli delle costanti di velocità.

- 1) **Connell D.W.** (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **102**, pp 117-156.
- 2) **Bintin S., Devillers J. and Karcher W.** (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. *SAR and QSAR in Environmental Research*, **1**, 29-390.
- 3) **OECD**, Paris (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. *Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals*. No. 3.
- 4) **Kristensen P.** (1991) Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.
- 5) **US EPA** 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.
- 6) **US FDA**, (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, **1**, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.
- 7) **US EPA** (1974). Section 5, A(1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in *Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples*, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.
- 8) **Compaan H.** (1980) in 'The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation' Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, the Hague, The Netherlands.
- 9) **Gardner et al.** (1995) *Limn. & Oceanogr.* **30**, 1099-1105.
- 10) **Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J.** (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Envir. Toxicol. Chem.* **10**, pp 1431-1436.
- 11) **CEC**, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984-1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.
- 12) **ASTM E-1022-84** (Reapproved 1988) Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs

ALLEGATO 1

CARATTERISTICHE CHIMICHE DI UN'ACQUA DI DILUIZIONE ACCETTABILE

	SOSTANZA	CONCENTRAZIONE LIMITE
1	Solidi sospesi	5 mg/l
2	Carbonio organico totale	2 mg/l
3	Ammoniaca non ionizzata	1 µg/l
4	Cloro residuo	10 µg/l
5	Pesticidi organofosforati totali	50 ng/l
6	Pesticidi organoclorurati totali più bifenili policlorurati	50 ng/l
7	Cloro organico totale	25 ng/l
8	Alluminio	1 µg/l
9	Arsenico	1 µg/l
10	Cromo	1 µg/l
11	Cobalto	1 µg/l
12	Rame	1 µg/l
13	Ferro	1 µg/l
14	Piombo	1 µg/l
15	Nichel	1 µg/l
16	Zinco	1 µg/l
17	Cadmio	100 ng/l
18	Mercurio	100 ng/l
19	Argento	100 ng/l

ALLEGATO 2

SPECIE ITTICHE RACCOMANDATE PER L'ESECUZIONE DEL SAGGIO

	Specie raccomandata	Intervallo di temperatura raccomandato per la prova (°C)	Lunghezza totale raccomandata dell'animale di prova (cm)
1	Danio rerio ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Danio zebrato	20 - 25	3,0 ± 0,5
2	Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead minnow	20 - 25	5,0 ± 2,0
3	Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Carpa comune	20 - 25	5,0 ± 3,0
4	Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck e Schlegel) Ricefish	20 - 25	4,0 ± 1,0
5	Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy	20 - 25	3,0 ± 1,0
6	Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) Bluegill	20 - 25	5,0 ± 2,0
7	Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Trota iridea	13 - 17	8,0 ± 4,0
8	Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) Spinarello	18 - 20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, p. 231

Varie specie di estuario e marine sono in uso in differenti paesi, per esempio:

Corvina striata	<u><i>Leiostomus xanthurus</i></u>
Sheepshead minnow	<u><i>Cyprinodon variegatus</i></u>
Latterino	<u><i>Menidia beryllina</i></u>
Shiner perch	<u><i>Cymatogaster aggregata</i></u>
English sole	<u><i>Parophrys vetulus</i></u>
Staghorn sculpin	<u><i>Leptocottus armatus</i></u>
Spinarello	<u><i>Gasterosteus aculeatus</i></u>
Spigola	<u><i>Dicentracus labrax</i></u>
Alborella	<u><i>Alburnus alburnus</i></u>

RACCOLTA

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 che in laboratorio, in condizioni di controllo delle malattie e dei parassiti, in modo che gli animali di saggio siano sani e geneticamente controllati. Questi pesci sono disponibili in molte parti del mondo.

ALLEGATO 3

PREVISIONE DELLA DURATA DELLE FASI DI ASSORBIMENTO E DEPURAZIONE

1. Previsione della durata della fase di assorbimento

Prima di eseguire il saggio, 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 (P_{oa}) o tra k_2 e la solubilità in acqua (s).

Una stima di k_2 (giorni⁻¹) si può ottenere per esempio dalla seguente relazione empirica (1):

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \log_{10}(P_{oa}) + 1,47 (r^2=0,95) \quad \text{[equazione 1]}$$

Per altre relazioni vedi rif. (2).

Se il coefficiente di ripartizione (P_{oa}) non è noto, si può ricavare una stima (3) conoscendo la solubilità in acqua della sostanza da utilizzare:

$$\log_{10} (P_{oa}) = 0,862 \log_{10}(s) + 0,710 (r^2 = 0,994) \quad \text{[equazione 2]}$$

in cui s = solubilità (moli/l) : (n = 36)

Queste relazioni valgono solo per composti chimici con valori di P_{oa} compresi tra 2 e 6,5 (4).

Il tempo necessario per raggiungere una certa percentuale dello stato stazionario si può ricavare, applicando il valore stimato di k_2 , dall'equazione cinetica generale che descrive l'assorbimento e la depurazione (cinetica di primo ordine):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

o, se C_w è costante:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{[equazione 3]}$$

Approssimandosi allo stato stazionario, ($t \rightarrow \infty$), l'equazione 3 può venire ridotta (5) (6) a:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad \text{o} \quad C_f / C_w = k_1 / k_2 = BCF$$

Allora $k_1/k_2 \cdot C_w$ è un'approssimazione della concentrazione nel pesce allo "stato stazionario" ($C_{f,s}$).

L'equazione 3 può venire riscritta come:

$$C_f = C_{f,s} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{o} \quad \frac{C_f}{C_{f,s}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad \text{[equazione 4]}$$

Applicando l'equazione 4, si può prevedere il tempo necessario per raggiungere una certa percentuale dello stato stazionario quando k_2 sia stato pre-stimato con l'equazione 1 o 2.

Indicativamente, la durata statisticamente ottimale della fase di assorbimento per ottenere dati statisticamente accettabili (BCF_K) è il periodo necessario perchè la curva del logaritmo della concentrazione della sostanza in esame nel pesce contro il tempo su scala lineare raggiunga il suo punto medio, o $1,6/k_2$, o 80% dello stato stazionario, ma non più di $3,0/k_2$ o 95% dello stato stazionario (7).

Il tempo necessario per raggiungere l'80% dello stato stazionario si ottiene da (equazione 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \quad \text{o} \quad t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \quad \text{[equazione 5]}$$

Similmente, il 95% dello stato stazionario si ottiene da: $t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$ [equazione 6]

Per esempio, la durata della fase di assorbimento (a_s) per una sostanza in esame con $\log P_{oa} = 4$ sarà (utilizzando le equazioni 1,5,6):

$$\begin{aligned} \log_{10} k_2 &= -0,414 \cdot (4) + 1,47 & k_2 &= 0,652 \text{ giorni}^{-1} \\ a_s \text{ (80 pct)} &= 1,6/0,652, \text{ cioè } 2,45 \text{ giorni (59 ore)} \\ \text{o} \quad a_s \text{ (95 pct)} &= 3,0/0,652, \text{ cioè } 4,60 \text{ giorni (110 ore)} \end{aligned}$$

Similmente, per una sostanza con $s = 10^{-5}$ mol/l ($\log(s) = -5,0$), la durata dell'assorbimento sarà (utilizzando le equazioni 1,2,5,6):

$$\begin{aligned} \log_{10} (P_{oa}) &= -0,862 (-5,0) + 0,710 = 5,02 \\ \log_{10} K_2 &= -0,414 (5,02) + 1,47 \\ k_2 &= 0,246 \text{ giorni}^{-1} \\ a_s \text{ (80 pct)} &= 1,6/0,246, \text{ cioè } 6,5 \text{ giorni (156 ore)} \\ \text{o} \quad a_s \text{ (95 pct)} &= 3,0/0,246, \text{ cioè } 12,2 \text{ giorni (293 ore)} \end{aligned}$$

In alternativa, si può utilizzare l'espressione:

$$t_{eq} = 6,54 \times 10^{-3} P_{oa} + 55,31 \text{ (ore)}$$

per calcolare il tempo necessario per raggiungere uno stato stazionario efficace (4).

2. Previsione della durata della fase di depurazione

Una previsione del tempo necessario per ridurre il carico sul corpo ad una certa percentuale della concentrazione iniziale si può ricavare anch'essa dall'equazione generale che descrive l'assorbimento e la depurazione (cinetica di primo ordine) (1) (8).

Per la fase di depurazione, si assume che C_w sia zero. L'equazione si può ridurre a:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \quad \text{o} \quad C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

dove $C_{f,o}$ è la concentrazione all'inizio del periodo di depurazione. Una depurazione del 50% verrà allora raggiunta al tempo (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \quad \text{o} \quad t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Similmente, una depurazione del 95% verrà raggiunta a:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Se per il primo periodo si usa un assorbimento dell'80% ($1,6/k_2$) e nella fase di depurazione si usa una perdita del 95% ($3,0/k_2$), la fase di depurazione dura allora circa il doppio della fase di assorbimento.

È importante notare, tuttavia, che le stime sono basate sull'ipotesi che l'assorbimento e la depurazione seguano una cinetica di primo ordine. Se è ovvio che non viene seguita una cinetica di primo ordine, si devono impiegare modelli più complessi (p.es. rif (1)).

BIBLIOGRAFIA (dell'allegato 3)

- 1) **Spacie A.** and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. and Chem.* 1, pagine 309-320.
- 2) **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.
- 3) **Chiou C.T.** and Schmedding D.W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. *Environ. Sci. Technol.* 16 (1), pagine 4-10.
- 4) **Hawker D.W.** and Connell D.W. (1988) Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22 (6), pagine 701-707.
- 5) **Branson D.R.,** Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975) *Transactions of the American Fisheries Society*, 104 (4), pagine 785-792.
- 6) **Ernst W.** (1985) Accumulation in Aquatic organisms. In: *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4 pagine 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.
- 7) **Reilly P.M.,** Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, *Can. J. Chem. Eng.* 55, pagine 614-622.
- 8) **Könemann H.** and Van Leeuwen K. (1980) Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. *Chemosphere*, 9, pagine 3-19.

ALLEGATO 4

**ESEMPIO TEORICO DI UN PROGRAMMA DI CAMPIONAMENTO PER SAGGI DI BIOCONCENTRAZIONE
DI SOSTANZE CON LOG POA = 4.**

Campionamento del pesce	Programma di campionamento		No. di campioni d'acqua	No. di pesci per campione
	Frequenza minima richiesta (giorni)	Campionamento addizionale		
Fase di assorbimento	-1		2*	immettere 45-80 pesci
	0		2	
1st	0.3	0.4	2 (2)	4 (4)
2nd	0.6	0.9	2 (2)	4 (4)
3rd	1.2	1.7	2 (2)	4 (4)
4th	2.4	3.3	2 (2)	4 (4)
5th	4.7		2	6
Fase di depurazione				Trasferire il pesce in acqua esente dal composto chimico in esame
6th	5.0	5.3		4 (4)
7th	5.9	7.0		4 (4)
8th	9.3	11.2		4 (4)
9th	14.0	17.5		6 (4)

* Campionare l'acqua dopo l'erogazione di almeno 3 "volumi di camera".

I valori tra parentesi sono il numero di campioni (acqua, pesce) da prelevare se si esegue un campionamento addizionale.

Nota: La stima preliminare di k_2 per $\log P_{oa} = 4,0$ è di 0,652 giorni⁻¹. La durata totale dell'esperimento viene impostata su $3 \times a_s = 3 \times 4,6$ giorni, cioè 14 giorni. Per la stima di "as" vedi allegato 3.

ALLEGATO 5

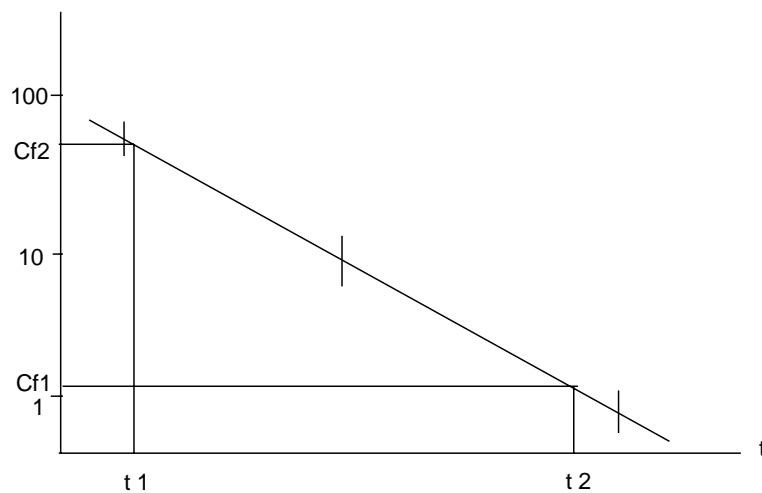
DIFFERENZIAZIONE DEI MODELLI

Si è supposto che la maggior parte dei dati di bioconcentrazione sia "ragionevolmente" ben descritta mediante un semplice modello a due compartimenti e due parametri, come indicato dalla curva rettilinea che approssima i punti delle concentrazioni nel pesce durante la fase di depurazione quando vengono tracciati su carta semilogaritmica. (Nel caso questi punti non possano essere descritti mediante una linea retta, impiegare modelli più complessi, vedi p.es. Spacie and Hamelink, Rif 1 nell'Allegato 3).

METODO GRAFICO PER LA DETERMINAZIONE DELLA COSTANTE DI VELOCITA' DI DEPURAZIONE (PERDITA) k_2

Tracciare la concentrazione della sostanza in esame trovata in ciascun campione di pesce contro il tempo su carta semilogaritmica. Il coefficiente angolare della linea è k_2 .

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Si noti che le deviazioni dalla linea retta possono indicare uno schema di depurazione più complesso di una cinetica di primo ordine. Per risolvere i tipi di depurazione che deviano dalla cinetica di primo ordine si può applicare un metodo grafico.

METODO GRAFICO PER LA DETERMINAZIONE DELLA COSTANTE DI VELOCITA' DI ASSORBIMENTO k_1

Dato K_2 , calcolare k_1 come segue:

$$k_1 = \frac{c_f k_2}{c_w X (1 - e^{-k_2 t})} \text{ [equazione 1]}$$

Il valore di C_f viene letto dal punto centrale del tratto piatto della curva di assorbimento ottenuta dai dati tracciando log concentrazione contro il tempo (su scala aritmetica).

METODO PER IL CALCOLO SU COMPUTER DELLE COSTANTI DI VELOCITA' DI ASSORBIMENTO E DEPURAZIONE (PERDITA)

Il mezzo preferito per ottenere il fattore di bioconcentrazione e le costanti di velocità k_1 e k_2 prevede l'uso di metodi di stima parametrica non lineare su computer. Questi programmi trovano i valori di k_1 e k_2 data una serie di dati sequenziali di concentrazione contro il tempo e il modello:

$$c_f = c_w \cdot \frac{k_1}{k_2} x(1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[equazione 2]}$$

$$c_f = c_w \cdot \frac{k_1}{k_2} x(e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad \text{[equazione 3]}$$

in cui si ha t_c = tempo al termine della fase di assorbimento.

Questo approccio fornisce stime della deviazione standard di k_1 e k_2 .

Poichè k_2 nella maggior parte dei casi può venire stimato con una precisione relativamente elevata dalla curva di depurazione, e poichè vi è una forte correlazione tra i due parametri, k_1 e k_2 se vengono stimati simultaneamente, e può essere conveniente calcolare per primo k_2 dai soli dati di depurazione e successivamente k_1 dai dati di assorbimento utilizzando una regressione non lineare.

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)(2) all'interno dell'Unione europea, per valutare gli effetti delle sostanze chimiche sulla crescita di giovani di trota iridea (*Oncorhynchus 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 (3)(4) e *Oryzias latipes* (5)(6)(7).

Vedi 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.

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 (vedi 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 (vedi 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 (2) 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: $\geq 1,5$ 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:

- 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 (vedi sezione 1.8.5 e allegato 1);
- e) bilancia sufficientemente precisa (precisione a $\pm 0,5$ %).

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 $\pm 0,5$ 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, etanolo, 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.

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 diluitoro 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 (2) ha dimostrato che, per la trota iridea, è accettabile una rimozione dell'acqua, durante il test, di 6 litri/g di pesce/die (vedi 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 (vedi 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)(2). 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*) (3)(4) e l'*Oryzias latipes* (5)(6)(7). 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.

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:

- a) obiettivo dello studio;
- b) metodo di analisi statistica che verrà impiegato;
- c) 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 (8). 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:

- a) 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.
- b) 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 (vedi sezioni 1.8.3 e 1.8.4).
- c) È possibile usare una serie geometrica adeguata allo scopo o una serie logaritmica (9) (vedi allegato 3). È preferibile un intervallo logaritmico fra le concentrazioni sperimentali.
- d) 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 (10). 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 (11) 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 (12)(13)(14). 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 (vedi 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 (10). 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 al minimo la differenza di peso tra i pesci all'inizio del test. L'allegato 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 $\pm 10\%$ 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.

La popolazione dello stock non va nutrita per 24 h 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 (vedi 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 (vedi 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 (vedi 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 (2) 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 (2)(15)(16)(17). La razione quotidiana può essere suddivisa in due porzioni uguali e offerta ai pesci in due pasti al giorno, a distanza di almeno 5 h 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 h precedenti alla pesatura i pesci non dovrebbero essere nutriti.

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 (vedi sezione 1.7.2). 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 (vedi 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 (vedi 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 (vedi 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 $\pm 20\%$ dei valori nominali (cioè entro l'intervallo 80-120 %; vedi 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 $\pm 20\%$ 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 $\pm 20\%$ 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 $\pm 20\%$ dei valori nominali, si devono analizzare tutte le concentrazioni sperimentali seguendo lo stesso regime adottato per le sostanze più stabili.

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 $\pm 20\%$ 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 $0,45\ \mu\text{m}$) o centrifugare i campioni, la centrifugazione è la procedura raccomandata. Comunque, se il materiale da testare non adsorbe 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 test 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, scolorimento) 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.

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

$\overline{\log_e w_1}$ = media dei logaritmi dei valori w_1 per i pesci nella vasca all'inizio del periodo di studio

$\overline{\log_e w_2}$ = 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.

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 EC₂₀ 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 (8)(18)(19)(20).

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 (vedi sezione 2.1), seguita da un metodo adeguato (ad esempio il test di Dunnett o di Williams (12)(13)(14)(21)) 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, (ne' di salvaguardarsi da essa) ma solo di quella dovuta alla variabilità esistente fra i singoli pesci. Tuttavia, l'esperienza ha dimostrato (8) 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 giustificare 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:

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 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.
- 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) Ashley S., Mallett M.J. and Grandy N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.
- (3) Crossland N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, **14**, pp 1855-1870.
- (4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, **21**, pp 157-164.
- (5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.
- (6) Holcombe , G.W., Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. and Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Arch. Environ. Conta. Toxicol. **28**, pp 287-297.
- (7) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. and Spehar, R.L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minesota.
- (8) Stephan C.E. and Rogers J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R C Bahner and D J Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp 328-338.
- (9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 p.
- (10) Cox D.R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.
- (11) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.
- (12) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc., **50**, pp 1096-1121.
- (13) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, **20**, pp 482-491.
- (14) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics **27**, pp 103-117.
- (15) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. Aquaculture **120**, 123-133.

- (16) Quinton, J. C. and Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, 37, 33-41.
- (17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in *Testbook of Fish Health*. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 P.
- (18) Bruce, R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494.
- (19) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. and McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA.
- (20) 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.
- (21) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, pp 510-531.

ALLEGATO 1

SPECIE DI PESCI RACCOMANDATE PER IL TEST E CONDIZIONI SPERIMENTALI ADEGUATE

Specie	Intervallo di temperatura raccomandato (°C)	Fotoperiodo (ore)	Intervallo raccomandato per il peso iniziale dei pesci (g)	precisione delle misura richiesta	Regime di carico (g/l)	Densità della popolazione (per litro)	Cibo	Durata del test (giorni)
Specie raccomandate:								
<u><i>Oncorhynchus mykiss</i></u> trota iridea	12,5 – 16,0	12 – 16	1 – 5	ai 100 mg più vicini	1,2 – 2,0	4	Cibo secco commerciale per avannotti di salmonidi	≥ 28
Altre specie ben documentate:								
<u><i>Danio rerio</i></u> danio zebra	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	all'1 mg più vicino	0,2 – 1	5 – 10	Cibo vivo (<i>Brachionus</i> <i>Artemia</i>)	≥ 28
<u><i>Oryzias latipes</i></u>	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	all'1 mg più vicino	0,2 – 1,0	5 – 20	Cibo vivo (<i>Brachionus</i> <i>Artemia</i>)	≥ 28

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 ng/l
Pesticidi organoclorurati totali più difenili policlorurati	< 50 ng/l
Cloro organico totale	< 25 ng/l

ALLEGATO 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	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 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/l o µg/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.

C.15 PESCI, PROVA DI TOSSICITÀ A BREVE TERMINE SUGLI STADI DI EMBRIONI E DI LARVA CON SACCO VITELLINO

1 METODO

Questo metodo di prova della tossicità a breve termine corrisponde al TG 212 (1998) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Questa prova di tossicità a breve termine sugli stadi di embrione e di larve con sacco vitellino di pesci è una prova a breve termine in cui vengono esposti i pesci negli stadi che vanno dall'uovo appena fertilizzato alla fine dello stadio di larve con sacco vitellino. La prova sugli embrioni e sulle larve con sacco vitellino non prevede alcun tipo di alimentazione e va pertanto concluso mentre le larve con sacco vitellino sono ancora nutrite dal sacco vitellino.

L'obiettivo della prova è definire gli effetti letali e, limitatamente, subletali di sostanze chimiche sugli specifici stadi vitali e specie sottoposti alla prova. Questa prova è in grado di fornire informazioni utili in quanto (a) può fare da nesso fra le prove letali e subletali, (b) può essere utilizzato come prova di screening in una "prova completa su stadi di vita precoci" per una prova di tossicità cronica e (c) può essere usato per saggiare specie per le quali le tecniche di allevamento non sono sufficientemente avanzate per coprire il periodo di transizione dall'alimentazione endogena a quella esogena.

È necessario ricordare che, in generale, solo le prove che comprendono tutti gli stadi del ciclo vitale dei pesci sono in grado di fornire una stima accurata della tossicità cronica delle sostanze chimiche nei confronti dei pesci e che eventuali riduzioni dell'esposizione in funzione dei diversi stadi di vita possono diminuire la sensibilità della prova e quindi sottovalutare la tossicità cronica. Si ritiene pertanto che la prova sugli embrioni e su larve con sacco vitellino sia meno sensibile di una "prova completa su stadi di vita precoci", soprattutto rispetto a sostanze chimiche altamente lipofile ($\log P_{ow} > 4$) e a sostanze chimiche con un meccanismo di azione tossica specifico. Comunque, si prevede che per sostanze chimiche con un modo di azione narcotico non specifico le differenze di sensibilità fra le due prove siano minori (1).

Prima della sua pubblicazione la presente prova sugli embrioni e su larve con sacco vitellino è stata per la maggior parte condotta sul pesce d'acqua dolce *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae – nome comune: danio zebtrato). Per questo motivo l'allegato 1 contiene indicazioni più dettagliate sull'esecuzione della prova su questa specie, ma ciò non impedisce di utilizzare altre specie con le quali sono già state fatte esperienze (Tabella 1).

1.2 DEFINIZIONI

Minima concentrazione con effetti significativi (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): è la più bassa concentrazione saggiata di una sostanza di prova alla quale si osserva un effetto significativo ($p < 0,05$) rispetto al controllo. Tuttavia, tutte le concentrazioni al di sopra della LOEC devono avere un effetto dannoso uguale o superiore a quello osservato alla LOEC.

Massima concentrazione senza effetti significativi (No Observed Effect Concentration, NOEC): è la concentrazione di prova immediatamente inferiore alla LOEC.

1.3 PRINCIPIO DELLA PROVA

Gli stadi di embrione e di larva con sacco vitellino vengono esposti a un intervallo di concentrazioni della sostanza di prova disciolta in acqua. Il protocollo consente di optare per una procedura semistatica o per una a flusso continuo in funzione della natura della sostanza in esame. La prova inizia con la collocazione delle uova fecondate in contenitori di prova e termina subito prima che il sacco vitellino di una qualsiasi delle larve in una delle camere di prova sia completamente assorbito, o prima che i controlli inizino a morire per mancanza di cibo. Gli effetti letali e subletali vengono valutati e confrontati con i valori relativi ai controlli allo scopo di determinare la minima concentrazione alla quale si osservano effetti significativi (LOEC) e di conseguenza la concentrazione senza effetti significativi (NOEC). In alternativa, è possibile valutare gli effetti tramite un modello di regressione per stimare la concentrazione capace di causare una determinata percentuale di effetto (cioè LC/EC_x, dove x è una % di effetto definita).

1.4 INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA DI PROVA

Dovrebbero essere disponibili i risultati di una prova di tossicità acuta (vedi Metodo C.1) eseguito preferibilmente sulla stessa specie scelta per la presente prova. I risultati possono essere utili per scegliere un intervallo adeguato di concentrazioni di prova nella prova sugli stadi di vita precoci. Occorre conoscere i valori relativi alla solubilità in acqua (compresa la solubilità nell'acqua utilizzata per la prova) e alla tensione di vapore della sostanza di prova. Occorre inoltre disporre di 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 sulla sostanza in esame utili per definire le condizioni di esecuzione della prova sono: formula di struttura, purezza della sostanza, fotostabilità, stabilità nelle condizioni di esecuzione della prova, pK_a, P_{ow} e risultati di una prova di biodegradabilità immediata (vedi Metodo C.4).

1.5 VALIDITÀ DELLA PROVA

Perché una prova sia valido devono realizzarsi le seguenti condizioni:

- 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 negli allegati 2 e 3;
- la concentrazione dell'ossigeno disciolto deve essere compresa fra il 60 e il 100 % del valore di saturazione nell'aria per tutta la durata della prova;
- la temperatura dell'acqua non deve mai differire di oltre $\pm 1,5$ °C fra le diverse camere di prova, né fra i vari giorni, e dovrebbe restare negli intervalli di temperatura indicata per le specie utilizzate nella prova (allegati 2 e 3).

1.6 DESCRIZIONE DEL METODO UTILIZZATO

1.6.1 Contenitori di prova

Si può utilizzare qualsiasi tipo di recipiente in vetro o in altro materiale chimicamente inerte. Le dimensioni dei recipienti devono essere proporzionate al regime di carico (vedi sezione 1.7.1.2). Si raccomanda di randomizzare la collocazione delle camere di prova nella zona della prova. Se nel laboratorio sussistono effetti sistematici controllabili tramite separazione per blocchi, è preferibile utilizzare un disegno sperimentale a blocchi randomizzati in cui ciascun trattamento è presente in ciascun blocco, piuttosto che un disegno completamente randomizzato. Se si opta per il disegno sperimentale a blocchi, occorre tenerne conto anche in sede di analisi dei dati. Le camere di prova devono essere protette da eventuali disturbi.

1.6.2 **Selezione della specie ittica**

Le specie ittiche raccomandate sono elencate nella Tabella 1A. Ciò non preclude l'uso di altre specie (vedi esempi nella Tabella 1B), ma in questo caso potrebbe essere necessario adattare la procedura sperimentale per ottenere adeguate condizioni di esecuzione della prova. In tal caso occorre spiegare i criteri di scelta delle specie e del metodo sperimentale.

1.6.3 **Mantenimento dei pesci riproduttori**

Per informazioni dettagliate su come mantenere i pesci riproduttori in condizioni soddisfacenti, si rimanda al TG 210 dell'OCSE¹ e ai riferimenti bibliografici (2)(3)(4)(5)(6).

1.6.4 **Manipolazione di embrioni e larve**

All'interno del contenitore principale gli embrioni e le larve possono essere esposti in recipienti più piccoli forniti di rete ai lati o alle estremità per consentire il flusso della soluzione di prova attraverso il recipiente. Si può indurre un flusso non turbolento in questi recipienti più piccoli sospendendoli a un braccio sistemato in modo che muova il recipiente verticalmente, mantenendo però sempre sommersi gli organismi; è possibile usare anche un sistema di flusso a sifone. Le uova fecondate dei pesci salmonidi possono essere sistemate su rastrelliere o reti con aperture sufficientemente grandi da permettere alle larve di cadere fuori dopo la schiusa delle uova. Per rimuovere gli embrioni e le larve nella prova semistatica con rinnovo quotidiano completo dell'acqua sono adatte pipette Pasteur.

I contenitori, le griglie o le reti eventualmente utilizzati per tenere le uova all'interno della vasca principale vanno rimossi, in quanto ostacoli, dopo la schiusa delle larve¹; le reti vanno invece lasciate per evitare la fuga dei pesci. Dovendo trasferire le larve, queste non dovrebbero essere esposte all'aria e per rilasciare i pesci dai contenitori per le uova non si devono usare retini (questa precauzione può essere superflua per alcune specie meno delicate, come la carpa). Il trasferimento, i cui tempi dipendono dalla specie, non è sempre necessario. Per la tecnica semistatica si possono usare beaker o contenitori poco profondi e, se necessario, forniti di un divisorio a rete lievemente sopraelevato rispetto al fondo. Se il volume dei contenitori è sufficiente a soddisfare le richieste di carico (vedi 1.7.1.2) il trasferimento degli embrioni o delle larve può essere evitato.

1.6.5 **Acqua**

Per la prova si può utilizzare qualunque tipo di acqua conforme alle caratteristiche chimiche di un'acqua di diluizione accettabile, come descritta nell'allegato 4, e in cui la specie utilizzata nella prova dimostra una capacità di sopravvivenza dei controlli almeno pari a quella descritta negli allegati 2 e 3. La qualità dell'acqua dovrebbe essere costante per tutta la durata della prova. Il pH dovrebbe rimanere entro un intervallo di $\pm 0,5$ unità di pH. Per escludere la possibilità di effetti indesiderati dell'acqua di diluizione sui risultati della prova (ad esempio per complessazione della sostanza in esame) o influenze negative sulla performance dei pesci riproduttori è utile prelevare di quando in quando alcuni 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 SO₄), dei pesticidi (ad esempio pesticidi organofosforati totali e organoclorurati totali), del carbonio organico totale e dei solidi sospesi 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).

¹ OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, "Fish, Early-life Stage Toxicity Test".

1.6.6 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 e ultrasuoni). Per ottenere una concentrazione adeguata della soluzione madre si possono utilizzare colonne di saturazione (colonne di solubilità). Per quanto possibile va evitato l'utilizzo di solventi o disperdenti (agenti solubilizzanti); tuttavia, in alcuni casi tali composti possono essere necessari per ottenere una soluzione madre di concentrazione adeguata. A tale scopo si prestano ad esempio solventi quali acetone, etanolo, metanolo, 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. Qualora si utilizzi un agente solubilizzante questo non deve avere effetti significativi sulla sopravvivenza né effetti negativi visibili sui primi stadi di vita degli organismi come è dimostrato da un controllo con solo solvente. L'uso di questi materiali dovrebbe essere evitato il più possibile.

Per la tecnica semistatica è possibile seguire due diverse procedure di rinnovo dell'acqua: (i) si preparano nuove soluzioni di prova in recipienti puliti e si trasferiscono delicatamente le uova e le larve sopravvissute nei nuovi recipienti utilizzando un piccolo volume di soluzione vecchia ed evitando l'esposizione all'aria, oppure (ii) gli organismi della prova sono mantenuti nei recipienti mentre viene cambiata una parte (almeno tre quarti) dell'acqua. La frequenza di rinnovo del mezzo dipende dalla stabilità della sostanza di prova, ma si raccomanda di sostituire l'acqua quotidianamente. Se da prove preliminari di stabilità (vedi sezione 1.4) la concentrazione della sostanza di prova 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 le operazioni di rinnovo dell'acqua, occorre prendere in considerazione l'opportunità di utilizzare una prova a flusso continuo. In ogni caso occorre evitare di sottoporre le larve a stress durante l'operazione di rinnovo dell'acqua.

Le prove a flusso continuo comportano l'uso di un sistema che eroghi e diluisca di continuo la soluzione madre della sostanza in esame (ad esempio pompa dosatrice, diluitor proporzionale, 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 presentare variazioni superiori al 10 % per tutta la durata della prova. Si considera adeguata una portata equivalente ad almeno cinque volte il volume della camera di prova ogni 24 ore (2).

1.7 PROCEDURA

In letteratura si trovano informazioni utili sull'esecuzione della prova di tossicità sugli stadi di embrione e di larve con sacco vitellino di pesci; alcuni riferimenti sono elencati nella bibliografia della presente prova (7)(8)(9).

1.7.1 Condizioni di esposizione

1.7.1.1 Durata

La prova dovrebbe avere inizio preferibilmente entro 30 minuti dalla fecondazione delle uova. Gli embrioni vanno immersi nella soluzione di prova prima o immediatamente dopo l'inizio dello stadio di segmentazione del blastodisco e, comunque, prima che inizi lo stadio di gastrula. Se le uova provengono da fornitori esterni può risultare impossibile iniziare la prova subito dopo la fecondazione. Poiché un ritardo nell'avvio della prova può influire fortemente sulla sua sensibilità, la prova dovrebbe iniziare entro 8 ore dalla fecondazione. Dato che le larve non vengono nutrite durante il periodo di esposizione, la prova dovrebbe terminare subito prima che il sacco vitellino di una qualsiasi delle larve in una delle camere di prova sia stato completamente assorbito, o prima che i controlli inizino a morire per mancanza di cibo. La durata della prova dipende dalla specie utilizzata. Gli allegati 2 e 3 contengono alcune raccomandazioni al riguardo.

1.7.1.2 *Carico*

All'inizio della prova il numero di uova fecondate deve essere sufficiente a soddisfare le richieste dell'analisi statistica. Le uova dovrebbero essere distribuite a caso fra i trattamenti e per ogni concentrazione si dovrebbero usare almeno 30 uova fecondate, divise equamente (o il più equamente possibile, visto che con alcune specie può essere difficile ottenere lotti uguali) tra almeno tre repliche. Il regime di carico (biomassa per volume di soluzione di prova) deve essere abbastanza basso da consentire di mantenere senza aerazione una concentrazione di ossigeno disciolto pari ad almeno il 60 % del valore di saturazione nell'aria. 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 (2).

1.7.1.3 *Luce e temperatura*

Il fotoperiodo e la temperatura dell'acqua di prova devono essere adatti alla specie utilizzata (allegati 2 e 3). Per controllare la temperatura si può utilizzare unrecipiente di prova aggiuntivo.

1.7.2 **Concentrazioni della sostanza di prova**

Di norma occorrono cinque concentrazioni della sostanza in esame che differiscano di un fattore costante non superiore a 3,2. Nella scelta dell'intervallo delle concentrazioni bisogna tenere conto della curva che pone in relazione la CL_{50} al periodo di esposizione nello studio della tossicità acuta. In alcune circostanze, ad esempio nelle prove limite, può essere appropriato impiegare meno di cinque concentrazioni a un intervallo di concentrazione più ristretto. Se si utilizzano meno di cinque concentrazioni occorre spiegarne il motivo. Non è necessario provare concentrazioni della sostanza superiori alla CL_{50} nelle 96 ore o a 100 mg/l, qualsiasi sia la più bassa. Le sostanze non dovrebbero essere provate a concentrazioni al di sopra del loro limite di solubilità nell'acqua di prova.

Se nella preparazione delle soluzioni di prova si utilizza un agente solubilizzante (vedi sezione 1.6.6), la sua concentrazione finale nei recipienti di prova non dovrebbe superare 0,1 ml/l e dovrebbe essere uguale in tutti i recipienti.

1.7.3 **Controlli**

In aggiunta alle concentrazioni della sostanza in esame, dovrebbe essere allestito un controllo con l'acqua di diluizione (ripetendola in modo adeguato) ed eventualmente controllo con acqua contenente l'agente solubilizzante (ripetendola in modo adeguato), ambedue con un adeguato numero di repliche.

1.7.4 **Frequenza delle determinazioni e delle misurazioni analitiche**

Durante la prova vanno determinate a intervalli regolari le concentrazioni della sostanza di prova.

Nella prova semistatica in cui si prevede che la concentrazione della sostanza in esame si mantenga intorno a $\pm 20\%$ del valore nominale (ovvero entro un intervallo di 80 - 120 %; vedi sezioni 1.4. e 1.6.6), si raccomanda, come minimo, di analizzare le concentrazioni minima e massima subito dopo la preparazione e immediatamente prima del rinnovo dell'acqua almeno tre volte a intervalli regolari nel corso della prova (le analisi vanno effettuate su un campione della stessa soluzione preparata di fresco e poi al momento di rinnovarla).

Quando si prevede che la concentrazione della sostanza in esame non si mantenga intorno a $\pm 20\%$ del valore nominale (in base ai dati sulla stabilità della sostanza), è necessario analizzare tutte le concentrazioni di prova, preparate di fresco e al momento di rinnovarle, ma seguendo lo stesso schema (cioè almeno tre volte a intervalli regolari nel corso della prova). È sufficiente determinare le concentrazioni della sostanza in esame prima di rinnovare la soluzione solo su una replica per ogni concentrazione. L'intervallo fra le determinazioni analitiche non deve superare i sette giorni. Si raccomanda che i risultati siano basati sulle concentrazioni misurate. Tuttavia se è possibile provare che durante tutta la prova la concentrazione della sostanza di prova nella soluzione è stata mantenuta in modo soddisfacente entro $\pm 20\%$ della concentrazione nominale o della concentrazione iniziale misurata, i risultati possono essere basati sui valori nominali o sui valori iniziali misurati.

Per le prove a flusso continuo è appropriato l'uso di un regime di campionamento simile a quello descritto per i le prove semistatiche (sebbene in questo caso non si effettui la misurazione delle soluzioni "vecchie"). Se però la durata della prova supera i sette giorni, può essere consigliabile aumentare il numero di campionamenti durante la prima settimana (ad esempio, tre serie di misurazioni) per assicurare che le concentrazioni di prova restino stabili.

Può essere necessario centrifugare o filtrare i campioni (ad esempio con filtro con pori di 0,45 µm). Poiché tuttavia né la centrifugazione né la filtrazione sembrano essere sempre in grado di separare la frazione non biodisponibile della sostanza in esame da quella biodisponibile, i campioni non devono necessariamente essere sottoposti a questi trattamenti.

Durante la prova in tutti i recipienti di prova dovrebbero essere misurati l'ossigeno disciolto, il pH e la temperatura. La durezza totale e la salinità (se del caso) vanno misurate nei controlli e in un recipiente alla concentrazione massima. L'ossigeno disciolto ed eventualmente la salinità vanno misurati almeno tre volte (all'inizio, verso la metà e alla fine della prova). Nella prova semistatica 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 nella prova semistatica e almeno una volta alla settimana nella prova a flusso continuo. La durezza va misurata una sola volta per ciascuna prova. La temperatura dovrebbe essere misurata una volta al giorno e preferibilmente essere costantemente controllata almeno in un recipiente di prova.

1.7.5 **Osservazioni**

1.7.5.1 *Stadio dello sviluppo embrionale*

Lo stadio embrionale (stadio di gastrula) all'inizio dell'esposizione alla sostanza di prova va verificato nel modo più accurato possibile. Per far ciò si può utilizzare un campione rappresentativo di uova adeguatamente conservate e separate. Per la descrizione e l'illustrazione degli stadi embrionali si rimanda alla letteratura in materia (2)(5)(10)(11).

1.7.5.2 *Schiusa e sopravvivenza*

Almeno una volta al giorno occorre effettuare osservazioni sulla schiusa e la sopravvivenza e registrarne i dati. All'inizio della prova può essere consigliabile effettuare osservazioni più frequenti (ad esempio ogni 30 minuti durante le prime tre ore), poiché in alcuni casi i tempi di sopravvivenza possono avere maggiore importanza del solo numero di decessi (ad esempio in presenza di effetti tossici acuti). Gli embrioni e le larve morti vanno rimossi appena individuati in quanto possono decomporsi rapidamente. 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 dovute a coagulazione e/o precipitazione delle proteine, con conseguente aspetto bianco opaco;
- **per gli embrioni:** assenza di movimenti del corpo e/o assenza di battito cardiaco e/o di colorazione opaca nelle specie in cui gli embrioni sono normalmente traslucidi;
- **per le larve:** 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.

1.7.5.3 *Anomalie dell'aspetto*

A intervalli adeguati, a seconda della durata della prova e della natura dell'anomalia descritta, vanno registrati il numero di larve che presentano anomalie morfologiche e/o della pigmentazione, e lo stadio di assorbimento del sacco vitellino. Va rilevato 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.

1.7.5.4 *Anomalie del comportamento*

Le anomalie, quali iperventilazione, movimenti natatori scoordinati e inattività atipica, dovrebbero essere registrate a intervalli adeguati in funzione della durata della prova. Il rilevamento di tali effetti, per quanto difficili da quantificare, può facilitare l'interpretazione dei dati sulla mortalità, cioè fornire informazioni sul modo d'azione tossica della sostanza.

1.7.5.5 *Lunghezza*

Alla fine della prova si raccomanda di misurare la lunghezza degli individui, che può essere quella standard, alla biforcazione della pinna caudale o quella totale. In caso di marcescenza della pinna caudale o erosione della pinna, si dovrebbe misurare la lunghezza standard. Generalmente, in una prova ben eseguita, il coefficiente di variazione della lunghezza tra le repliche dei controlli dovrebbe essere $\leq 20\%$.

1.7.5.6 *Peso*

Alla fine della prova si può procedere alla pesatura degli individui; i pesi a secco (24 ore a 60 °C) sono preferibili ai pesi umidi (dopo asciugatura). Generalmente, in una prova ben eseguita, il coefficiente di variazione del peso tra le repliche dei controlli dovrebbe essere $\leq 20\%$.

Al termine delle osservazioni alcuni o tutti i seguenti dati saranno disponibili per l'analisi statistica:

- mortalità cumulativa;
- numero di larve sane alla fine della prova;
- tempo all'inizio della schiusa e alla fine della schiusa (90 % di schiusa in ogni replica);
- numero di larve che si schiudono ogni giorno;
- lunghezza (e peso) degli animali sopravvissuti alla fine della prova;
- numero delle larve deformi o di aspetto anomalo;
- numero delle larve che presentano un comportamento anomalo.

2. DATI E RELAZIONE

2.1 TRATTAMENTO DEI RISULTATI

Si raccomanda di ricorrere a personale esperto di statistica sia per la concezione del disegno sperimentale che per l'analisi statistica dei risultati della prova, in quanto il metodo consente considerevoli variazioni nel disegno sperimentale, ad esempio nel numero di camere di prova e numero di concentrazioni di prova, nel numero iniziale di uova fecondate e nei parametri da misurare. Viste le diverse possibili opzioni di disegno sperimentale, in questa sede non si forniscono indicazioni specifiche sulle procedure statistiche.

Dovendo stimare i valori LOEC/NOEC sarà necessario analizzare le variazioni all'interno di ogni serie di repliche mediante l'analisi della varianza (ANOVA) o tabelle di contingenza. Per effettuare un confronto multiplo fra i risultati delle singole concentrazioni e quelli dei controlli, può essere utile il metodo di Dunnett (12)(13). Allo scopo sono disponibili anche altri metodi (14)(15). Occorre calcolare e riportare l'entità dell'effetto individuabile mediante ANOVA o altre procedure (vale a dire la potenza della prova). Va rilevato che non tutti i dati elencati nella sezione 1.7.5.6 sono adatti all'analisi statistica mediante ANOVA. Per esempio, la mortalità cumulativa e il numero delle larve sane alla fine della prova potrebbero essere analizzati con metodi dei probit.

Dovendo stimare i valori CL/CE_x occorre adottare una curva/e adeguata/e (ad es. la curva logistica) ai dati da analizzare mediante un metodo statistico come quello dei minimi quadrati o dei minimi quadrati non lineare. La/e curva/e dovrebbe/ro essere parametrizzata/e in modo da consentire di stimare direttamente la CL/CE_x di interesse e il suo errore standard. Ciò faciliterà notevolmente il calcolo dei limiti di confidenza della CL/CE_x. A meno che vi siano buoni motivi per preferire livelli fiduciali diversi dovrebbero essere riportati limiti di confidenza a due code ad un livello fiduciale del 95 %. La procedura di adattamento della curva dovrebbe preferibilmente consentire di valutare il significato della mancanza di adattamento (lack of fit). È possibile usare metodi grafici per l'adattamento delle curve. L'analisi di regressione è adatta a tutti i dati elencati nella sezione 1.7.5.6.

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. Occorre usare cautela anche nell'interpretazione dei risultati riferiti a concentrazioni al di sopra della solubilità in acqua della sostanza.

2.3 RELAZIONE SULLA PROVA

La relazione sulla prova deve contenere le seguenti informazioni:

2.3.1 Sostanza di prova:

- natura fisica e proprietà fisico-chimiche rilevanti;
- dati chimici di identificazione, compresi purezza e metodo analitico per la quantificazione della sostanza di prova, se del caso.

2.3.2 Specie utilizzata:

- nome scientifico, ceppo, numero di pesci riproduttori (cioè quante femmine sono state usate per produrre il numero di uova necessarie per la prova), origine e metodo di raccolta delle uova fecondate e successiva manipolazione.

2.3.3 **Condizioni di esecuzione della prova:**

- procedura di prova utilizzata (ad esempio semistatica o a flusso continuo, periodo di tempo dalla fecondazione all'inizio della prova, carico, ecc.);
- fotoperiodo/i;
- disegno sperimentale (ad esempio, numero di camere di prova e repliche , numero di embrioni per replica;
- metodo di preparazione delle soluzioni madre e frequenza di rinnovo (l'agente solubilizzante, se usato, deve essere indicato insieme alla sua concentrazione);
- concentrazioni nominali di prova, valori misurati, loro medie e deviazioni standard nei recipienti di prova e metodo con cui sono state ottenute e, se la sostanza è solubile in acqua a concentrazioni inferiori a quelle provate , va dimostrato che le misurazioni si riferiscono alle concentrazioni della sostanza di prova in soluzione;
- caratteristiche dell'acqua di diluizione: 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 nei recipienti di prova: pH, durezza, temperatura e concentrazione di ossigeno disciolto.

2.3.4 **Risultati:**

- risultati di eventuali studi preliminari sulla stabilità della sostanza di prova;
- dimostrazione che i controlli rispondono allo standard di accettabilità di sopravvivenza complessiva della specie in esame (allegati 2 e 3);
- dati sulla mortalità/sopravvivenza agli stadi embrionale e larvale e mortalità/sopravvivenza complessiva;
- giorni alla schiusa e numero di uova schiuse;
- dati relativi alla lunghezza (e al peso);
- incidenza e descrizione delle eventuali anomalie morfologiche;
- incidenza e descrizione degli eventuali effetti sul comportamento;
- analisi statistica e trattamento dei dati;
- per le prove analizzate mediante ANOVA, minima concentrazione con effetti significativi (LOEC) con $p=0,05$ e massima concentrazione senza effetti significativi (NOEC) per ogni risposta analizzata, compresa una descrizione delle procedure statistiche utilizzate e un'indicazione dell'entità dell'effetto che poteva essere individuato;
- per le prove analizzate mediante tecniche di regressione, CL/CE_x e intervalli di confidenza, nonché un grafico del modello adattato usato per i relativi calcoli;
- spiegazione di eventuali deviazioni da questo metodo.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Kristensen P. (1990) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, pp 60. June 1990.
- (2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.
- (3) Brauhn J.L. and Schoettger R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p.54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
- (4) Brungs W.A. and Jones B.R. (1977) Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (5) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, 121-173.
- (6) Legault R. (1958) A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp 328-330.
- (7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp 61-71.
- (8) Birge J.W., Black J.A. and Westerman A.G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp 807-821.
- (9) Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquatic Toxicology, 9, 129-145.
- (10) Kirchen R.V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.
- (11) Kirchen R.V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.
- (12) Dunnett C.W. (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp 1096-1121.
- (13) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482-491.
- (14) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.
- (15) Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp 321-334.
- (16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, pp 81.

- (17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, 126-134.
- (18) Meyer A., Bierman C.H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology - an invitation to the comparative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: 231-236.
- (19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, 19-28.
- (20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- (21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- (22) De Graeve G.M., Cooney J.D., McIntyre D.O., Poccocic T.L., Reichenbach N.G., Dean J.H. and Marcus M.D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, 1189-1203.
- (23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.
- (24) Balon E.K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.
- (25) Blaxter J.H.S. (1988). Pattern and variety in development, In: W.S. Hoar and D.J. Randall Eds., Fish Physiology, vol. XIA, Academic press, pp 1-58.

TABELLA 1A : SPECIE DI PESCI RACCOMANDATE PER LA PROVA

ACQUA DOLCE
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Trotta iridea (9)(16)
<i>Danio rerio</i> Danio zebrato (7)(17)(18)
<i>Cyprinus caprio</i> Carpa (8)(19)
<i>Oryzias latipes</i> (20)(21)
<i>Pimephales promelas</i> (8)(22)

**TABELLA 1B: ESEMPI DI ALTRE SPECIE BEN DOCUMENTATE
PARIMENTI UTILIZZATE**

ACQUA DOLCE	ACQUA SALATA
<i>Carassius auratus</i> Carassio dorato (8)	<i>Menidia peninsulae</i> Latterino menidia (23)(24)(25)
<i>Lepomis macrochirus</i> (8)	<i>Clupea harengus</i> Aringa (24)(25)
	<i>Gadus morhua</i> Merluzzo comune (24)(25)
	<i>Cyprinodon variegatus</i> (23)(24)(25)

ALLEGATO 1

GUIDA ALL'ESECUZIONE DI UNA PROVA DI TOSSICITÀ SUGLI EMBRIONI

E SULLE LARVE CON SACCO VITELLINO DEL DANIO ZEBRATO (*Brachydanio rerio*)

INTRODUZIONE

Il danio zebrato proviene dalla costa di Coromandel, in India, dove vive in corsi d'acqua a corso rapido. Si tratta di un comune pesce da acquario della famiglia delle carpe e le informazioni sulla sua cura e sul suo allevamento si trovano nella normale bibliografia sui pesci tropicali. La sua biologia e il suo impiego nella ricerca ittica sono stati riesaminati da Laale (1).

Questo pesce, che supera raramente i 45 mm di lunghezza, ha il corpo di forma cilindrica, con 7 - 9 strisce orizzontali blu scuro argentate che arrivano alla pinna caudale e anale. Il dorso è verde oliva. I maschi sono più sottili delle femmine, le quali sono più argentate e presentano l'addome disteso, soprattutto prima della deposizione delle uova.

Gli esemplari adulti sono in grado di tollerare ampie fluttuazioni di temperatura, pH e durezza dell'acqua, ma per ottenere pesci sani che producano uova di buona qualità è necessario creare le condizioni ottimali.

Durante la deposizione delle uova, il maschio insegue e colpisce la femmina con la testa e feconda le uova appena espulse. Le uova, trasparenti e non adesive, cadono sul fondo, dove possono essere mangiate dai genitori. La deposizione delle uova viene influenzata dalla luce. Se la luce del mattino è adeguata, in genere il pesce depone le uova nelle prime ore dopo l'alba.

Ogni femmina può produrre lotti di parecchie centinaia di uova a intervalli settimanali.

CONDIZIONI DEI PESCI RIPRODUTTORI, RIPRODUZIONE E STADI DI VITA PRECOCI

Scegliere un numero adeguato di pesci sani e tenerli in un'acqua adatta (vedi ad esempio l'allegato 4) per almeno 2 settimane prima della deposizione delle uova progettata. È necessario consentire al gruppo di pesci di riprodursi almeno una volta prima di produrre il lotto di uova da utilizzare nella prova. La densità dei pesci durante questo periodo non dovrebbe superare 1 grammo di pesce per litro. La sostituzione regolare dell'acqua o l'uso di sistemi di purificazione consente di mantenere una maggiore densità. La temperatura nelle di mantenimento dovrebbe essere mantenuta a 25 ± 2 °C. Il pesce deve avere una dieta varia che può essere costituita, per esempio, da mangime secco commerciale adatto, individui vivi appena schiusi di Artemia, chironomidi, Daphnia ed oligocheti (Enchytraeidae).

Di seguito vengono descritte due procedure che, nella pratica, hanno consentito di ottenere un lotto sufficiente di uova sane e fecondate per effettuare la prova:

- i. In una vasca contenente 50 litri di acqua di diluizione vengono posti 8 femmine e 16 maschi, schermati dalla luce diretta e lasciati il più possibile indisturbati per almeno 48 ore. Nel pomeriggio precedente l'inizio della prova sul fondo dell'acquario viene posto un vassoio per la deposizione delle uova, costituita da un telaio di plexiglas o di altro materiale adatto alto 5 - 7 mm, con una rete a maglia grossa di 2-5 mm fissata sul lato superiore e una rete a maglia fine di 10 - 30 μ m sul fondo. Alla rete a maglia grossa sono attaccati numerosi "alberi di deposizione" formati da corde di nylon non ritorte. I pesci vengono lasciati nell'oscurità per 12 ore, dopo di che viene accesa una luce debole che darà inizio alla deposizione delle uova. Circa 2 - 4 ore dopo la deposizione delle uova si rimuove l'apposito vassoio e si raccolgono le uova. Il vassoio impedisce ai pesci di cibarsi delle uova e, allo stesso tempo, consente di raccogliere facilmente. Il gruppo di pesci dovrebbe aver già deposto uova almeno una volta prima della deposizione di quelle destinate alla prova.

- ii. 5-10 pesci maschi e femmine vengono mantenuti singolarmente per almeno 2 settimane prima della deposizione delle uova progettata. Dopo 5 - 10 giorni l'addome delle femmine apparirà disteso e saranno visibili le loro papille genitali. I maschi non hanno papille. Le uova vengono deposte in apposite vasche fornite di un falso fondo di rete (come descritto sopra). La vasca è riempita di acqua di diluizione, con una profondità di 5-10 cm al di sopra della rete. Il giorno prima della prevista deposizione si introducono nella vasca una femmina e due maschi. La temperatura dell'acqua viene progressivamente aumentata di un grado oltre la temperatura di acclimatazione. Si spegne la luce e si lascia la vasca il più possibile indisturbata. Il mattino seguente si accende una luce debole che darà inizio alla deposizione delle uova. Dopo 2-4 ore si rimuovono i pesci e si raccolgono le uova. Se sono necessarie più uova rispetto a quelle ottenibili da una sola femmina si possono allestire contemporaneamente più vasche di deposizione. Registrando il successo riproduttivo delle singole femmine prima della prova (numero e qualità delle uova deposte), è possibile selezionare per l'allevamento le femmine che presentano maggiore successo riproduttivo.

Le uova vanno trasferite nei recipienti di prova mediante tubi di vetro (diametro interno non inferiore a 4 mm), dotate di bulbo contagocce flessibile. La quantità di acqua raccolta con le uova nel trasferimento dovrebbe essere la minima possibile. Le uova sono più pesanti dell'acqua e colano fuori dal tubo. Occorre evitare che le uova (e le larve) vengano a contatto con l'aria. Alcuni campioni del/i lotto/i vanno esaminati al microscopio per verificare che i primi stadi dello sviluppo non presentino irregolarità. Non è consentito disinfettare le uova.

Il tasso di mortalità delle uova è massimo entro le prime 24 ore dalla fecondazione. Spesso, in questo periodo, si registra una mortalità che varia tra il 5 e il 40 %. Le uova degenerano se non sono fecondate o per difetti dello sviluppo. Sembra che la qualità delle uova dipenda dalla femmina; infatti, alcune femmine producono costantemente uova di buona qualità, altre non vi riescono mai. Anche la velocità di sviluppo e la percentuale di schiusa variano da un lotto all'altro. Le uova fecondate e le larve con sacco vitellino sopravvivono bene, generalmente per oltre il 90 %. A 25 °C le uova si schiudono 3-5 giorni dopo la fecondazione e il sacco vitellino viene assorbito all'incirca 13 giorni dopo la fecondazione.

Lo sviluppo embrionale è stato accuratamente descritto da Hisaoka e Battle (2). Grazie alla trasparenza delle uova e delle larve dopo la schiusa è possibile seguire lo sviluppo del pesce e osservare la presenza di eventuali malformazioni. Circa 4 ore dopo la deposizione è possibile distinguere le uova non fecondate da quelle fecondate (3). Per effettuare questo esame si pongono uova e larve in recipienti di prova di dimensioni ridotte e le si studiano al microscopio.

Le condizioni di esecuzione della prova che si applicano ai primi stadi di vita sono specificate nell'allegato 2. I valori ottimali del pH e della durezza dell'acqua di diluizione sono rispettivamente 7,8 e 250 mg CaCO₃/l.

CALCOLIE STATISTICA

Si propone un approccio a due fasi. Anzitutto si analizzano statisticamente i dati sulla mortalità, sulle anomalie dello sviluppo e sul tempo di schiusa. Poi si valuta statisticamente la lunghezza del corpo, per le concentrazioni alle quali non sono stati rilevati effetti negativi per nessuno dei precedenti parametri. Si consiglia questo approccio in quanto la sostanza tossica può uccidere selettivamente i pesci più piccoli, ritardare il tempo di schiusa e indurre gravi malformazioni, influenzando così i valori relativi alla lunghezza. Inoltre il numero di pesci da misurare per ogni trattamento sarà all'incirca uguale, garantendo così la validità dei dati statistici.

DETERMINAZIONE DELLA CL₅₀ E DELLA CE₅₀

Si calcola la percentuale di uova e larve sopravvissute e la si corregge in base alla mortalità riscontrata nei controlli, mediante la formula di Abbot (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100 \right)$$

dove

P = % sopravvivenza corretta

P' = % sopravvivenza osservata nella concentrazione di prova

C = % sopravvivenza nel controllo

Se possibile, la CL₅₀ viene determinata alla fine della prova mediante un metodo adeguato.

Per includere nel calcolo statistico della CE₅₀ anche le anomalie morfologiche, si rimanda a Stephan (5).

STIMA DEI VALORI DI LOEC E NOEC

Uno degli obiettivi della prova sulle uova e sulle larve con sacco vitellino è paragonare le concentrazioni diverse da zero con il controllo, cioè determinare la LOEC. Occorre dunque utilizzare procedure di comparazione multipla (6)(7)(8)(9)(10).

BIBLIOGRAFIA

- (1) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. **10**, 121-173.
- (2) Hisaoka K.K. and Battle H.I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., **102**, pp 311.
- (3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, **2**, pp 173-181.
- (4) Finney D.J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp 1-333.
- (5) Stephan C.E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp 69-81.
- (6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., **50**, pp 1096-1121.
- (7) Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, **20**, 482-491.
- (8) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, **27**, pp 103-117.
- (9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics **28**, pp 519-531.
- (10) Sokal R.R. and Rohlf F.J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W.H. Freeman and Co., San Francisco.

ALLEGATO 2

CONDIZIONI DI ESECUZIONE DELLA PROVA, DURATA E CRITERI DI SOPRAVVIVENZA PER LE SPECIE RACCOMANDATE

SPECIE	TEMP (°C)	SALINITÀ (0/00)	FOTO- PERIODO (ore)	DURATA DEGLI STADI (giorni)		DURATA TIPICA DELLA PROVA	SOPRAVVIVENZA DEL CONTROLLO (% MINIMA)	
				Embrioni	Larve con sacco vitellino		Successo alla schiusa	Post-schiusa
ACQUA DOLCE								
<i>Brachydanio rerio</i> Danio zebrato	25 ± 1	–	12 – 16	3 – 5	8 – 10	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio di gastrula) fino a 5 giorni dopo la schiusa (8-10 gg)	80	90
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Trota iridea	10 ± 1 ⁽¹⁾ 12 ± 1 ⁽²⁾	–	0 ^(a)	30 – 35	25 – 30	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio gastrula) fino a 20 giorni dopo la schiusa (50-55 gg)	66	70
<i>Cyprinus carpio</i> Carpa	21 – 25	–	12 – 16	5	> 4	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio gastrula) fino a 4 giorni dopo la schiusa (8 - 9 gg)	80	75
<i>Oryzias latipes</i>	24 ± 1 ⁽¹⁾ 23 ± 1 ⁽²⁾	–	12 – 16	8 – 11	4 – 8	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio gastrula) fino a 5 giorni dopo la schiusa (13 - 16 gg)	80	80
<i>Pimephales promelas</i>	25 ± 2	–	16	4 – 5	5	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio gastrula) fino a 4 giorni dopo la schiusa (8 - 9 gg)	60	70

⁽¹⁾Per gli embrioni ⁽²⁾Per le larve ^(a)Buio per embrioni e larve fino a una settimana dopo la schiusa, tranne per le ispezioni. Poi luce debole per tutta la prova

ALLEGATO 3

CONDIZIONI DI ESECUZIONE DELLA PROVA, DURATA E CRITERI DI SOPRAVVIVENZA PER ALTRE SPECIE BEN DOCUMENTATE

SPECIE	TEMP (°C)	SALINITÀ (0/00)	FOTO- PERIODO (ore)	DURATA DEGLI STADI (giorni)		DURATA TIPICA DELLA PROVA SU EMBRIONI E LARVE CON SACCO VITELLINO	SOPRAVVIVENZA DEI CONTROLLI (% MINIMA)	
				EMBRIONI	LARVE CON SACCO VITELLINO		Successo alla schiusa	Post-schiusa
ACQUA DOLCE								
<i>Carassius auratus</i> Carassio dorato	24 ± 1	–	–	3 – 4	> 4	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio gastrula) fino a 4 giorni dopo la schiusa (7 gg)	–	80
<i>Lepomis macrochirus</i>	21 ± 1	–	16	3	> 4	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio gastrula) fino a 4 giorni dopo la schiusa (7 gg)	–	75
ACQUA SALATA								
<i>Menidia peninsulae</i> Latterino menidia	22 – 25	15 – 22	12	1.5	10	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio gastrula) fino a 5 giorni dopo la schiusa (6-7 gg)	80	60
<i>Clupea harengus</i> Aringa	10 ± 1	8 – 15	12	20 – 25	3 – 5	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio gastrula) fino a 3 giorni dopo la schiusa (23-27 gg)	60	80
<i>Gadus morhua</i> Merluzzo comune	5 ± 1	5 – 30	12	14 – 16	3 – 5	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio gastrula) fino a 3 giorni dopo la schiusa (18 gg)	60	80
<i>Cyprinodon variegatus</i>	25 ± 1	15 – 30	12	–	–	Appena possibile dopo la fecondazione (inizio stadio gastrula) fino a 4/7 giorni dopo la schiusa (28 gg)	> 75	80

ALLEGATO 4

**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 ng/l
Pesticidi organoclorurati totali più difenili policlorurati	< 50 ng/l
Cloro organico totale	< 25 ng/l

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 ($\mu\text{g}/\text{ape}$). 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).

DL₅₀ (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 DL₅₀ 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 h si registra quotidianamente la mortalità e la si confronta con i valori di controllo. Se il tasso di mortalità aumenta fra le 24 h e le 48 h mentre la mortalità dei controlli resta a livelli accettabili, ovvero $\leq 10\%$, il test deve essere protratto fino a un massimo di 96 h. Si analizzano i risultati per calcolare la DL₅₀ a 24 h e 48 h e, nel caso lo studio venga prolungato, a 72 h e 96 h.

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 DL₅₀ 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 $25 \pm 2^\circ\text{C}$. 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 (vedi 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.

Prima di iniziare il test si possono lasciare le api a digiuno per un massimo di 2 h. 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 DL₅₀ 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 DL₅₀. 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 (vedi 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 DL₅₀. Per ciascuna dose si utilizzano almeno tre gabbie, ognuna contenente dieci api. La sostanza tossica di elezione è il dimetoato, per il quale la DL₅₀ sulle 24 h 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).

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 h), 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 h 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 h 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 h, la durata del test va prolungata fino ad un massimo di 96 h, sempre che la mortalità fra i controlli non superi il 10 %.

1.6.4 Osservazioni

La mortalità viene registrata 4 h dopo l'inizio del test e in seguito dopo 24 h e 48 h dalla somministrazione della dose. In caso di prolungamento del periodo di osservazione occorre effettuare altre valutazioni a intervalli di 24 h, fino a un massimo di 96 h, sempre che la mortalità nei controlli non superi il 10 %.

È 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 h 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 (vedi sezione 1.6.4).

2. **DATI E RELAZIONE**

2.1 **DATI**

I dati vanno riassunti in una tabella che evidenzia 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.

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 DL₅₀ 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 DL₅₀;
- 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.1, 151-165. March 1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, 119-125.
- (3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 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, 265-267.

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 ($\mu\text{g}/\text{ape}$).

DL₅₀ (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 DL₅₀ 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 h. Se il tasso di mortalità aumenta fra le 24 h e le 48 h mentre la mortalità dei controlli resta a livelli accettabili, ovvero $\leq 10\%$ il test deve essere protratto fino a un massimo di 96 h. La mortalità va registrata quotidianamente e confrontata con i valori di controllo. I risultati vengono analizzati per calcolare la DL₅₀ a 24 h e 48 h e, nel caso lo studio sia prolungato, a 72 h e 96 h.

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 DL₅₀ 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 $25 \pm 2^\circ\text{C}$. 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 es. 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).

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 h 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 h e le 48 h, la durata del test va prolungata fino ad un massimo di 96 h, sempre che la mortalità fra i controlli non superi il 10 %.

1.6.4 **Osservazioni**

La mortalità va registrata 4 h 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 h, fino a un massimo di 96 h, sempre che la mortalità fra i controlli non superi il 10 %.

È 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 (vedi 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 h, 48 h ed eventualmente 72 h e 96 h) 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). 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.

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.1, 151-165. March ,1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) ,1981-1992. Journal of Apicultural Research 22 119-125.
- (3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 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, 265-267.

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.

Si veda 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 (es.: 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 chimiche. Non si è tenuto conto dell'adsorbimento che si verifica sulle particelle colloidali (diametro < 0.2 µm) generate dai terreni.

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 (Allegato 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 Δt_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
C_{st}	concentrazione di massa della soluzione di riserva della sostanza	$\mu\text{g cm}^{-3}$
C_0	concentrazione iniziale di massa della soluzione in esame a contatto col terreno	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	concentrazione di massa della sostanza nella fase acquosa al tempo t_i in cui l'analisi viene effettuata	$\mu\text{g cm}^{-3}$

$C_s^{ads}(eq)$	contenuto della sostanza adsorbita sul terreno all'equilibrio di adsorbimento	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{ads}(eq)$	concentrazione di massa della sostanza nella fase acquosa all'equilibrio di adsorbimento	$\mu\text{g cm}^{-3}$
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	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_{oc}	coefficiente di adsorbimento normalizzato per il carbonio organico	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_{om}	coefficiente di distribuzione normalizzato per la sostanza organica	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_F^{ads}	coefficiente di adsorbimento secondo Freundlich	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$1/n$	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	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_F^{des}	coefficiente di desorbimento secondo Freundlich	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$m_{aq}^{des}(t_i)$	massa della sostanza sotto esame desorbita dal terreno al tempo t_i	μg
$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	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	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{des}(eq)$	concentrazione di massa della sostanza sotto esame presente nella fase acquosa all'equilibrio di desorbimento	$\mu\text{g cm}^{-3}$
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_r^i	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_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 energetico, 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.

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'adsorbimento-desorbimento, è necessario disporre dei seguenti dati relativi alla sostanza sotto esame:

- solubilità in acqua (A.6.);
- tensione di vapore (A.4.) e/o costante della legge di Henry;
- degradazione abiotica: idrolisi in funzione del pH (C.7.);
- coefficiente di ripartizione (A.8.);
- biodegradabilità rapida (C.4.) o trasformazione aerobica ed anaerobica nel terreno;
- pKa delle sostanze ionizzabili;
- 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 ($S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$) 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) Agitatore od apparecchio equivalente, capace di mantenere il terreno in sospensione durante l'agitazione.
- c) Centrifuga, di preferenza ad alta velocità (capace p.e. di produrre più di 3000 g), a temperatura controllabile e che permetta di eliminare dalla soluzione acquosa le particelle di diametro superiore a 0,2 μ m. Durante l'agitazione e la centrifugazione i contenitori dovranno essere mantenuti coperti, per evitare la perdita di liquido e quelle dovute alla volatilità; per rendere minimo l'adsorbimento sui coperchi, questi dovranno essere disattivati (esempio: coperchi a vite rivestiti di teflon).
- d) Facoltativi: apparecchio da filtrazione; filtri con porosità da 0,2 μ m, 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 CaCl₂ 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 "Handbook 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.

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	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 [§]	< 0.5 - 1.5 [‡]	< 10 - 15 [§]	sabbia limacciosa
6	> 7.0	< 0.5 - 1.0 [‡]	40 - 65	limo argilloso/argilla
7	< 4.5	> 10	< 10	sabbia/sabbia limacciosa

* Secondo il sistema FAO e quello US (85).

§ 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.

‡ 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 trasversa di Mercatore/dato orizzontale europeo) od attraverso le sue coordinate geografiche; ciò permetterà di eseguire a 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.

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 °C). La disaggregazione 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 °C fino a peso sensibilmente costante (12 h 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 °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 (es.: metanolo, acetone); (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'aggiunta 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.

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 equilibratura (35)(59-62). Alcuni esempi, focalizzati sulla precisione, sono riportati nell'allegato 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 (p.e. 100 cm^3) di CaCl_2 0,01 M viene agitato per 4 h insieme a un'adeguata massa (p.e.: 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-equilibratura. 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 (es.: 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.

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 (Allegato 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 lineare¹. La relazione applicabile si ottiene rielaborando l'equazione (4) del K_d nella forma della (1):

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1 \right) K_d \quad (1)$$

ovvero, in forma logaritmica ed ammettendo che $R = m_{soil}/V_0$ e $A_{eq}\%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = - \log K_d + \log \left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1-A_{eq}\%/100)} \right] \quad (2)$$

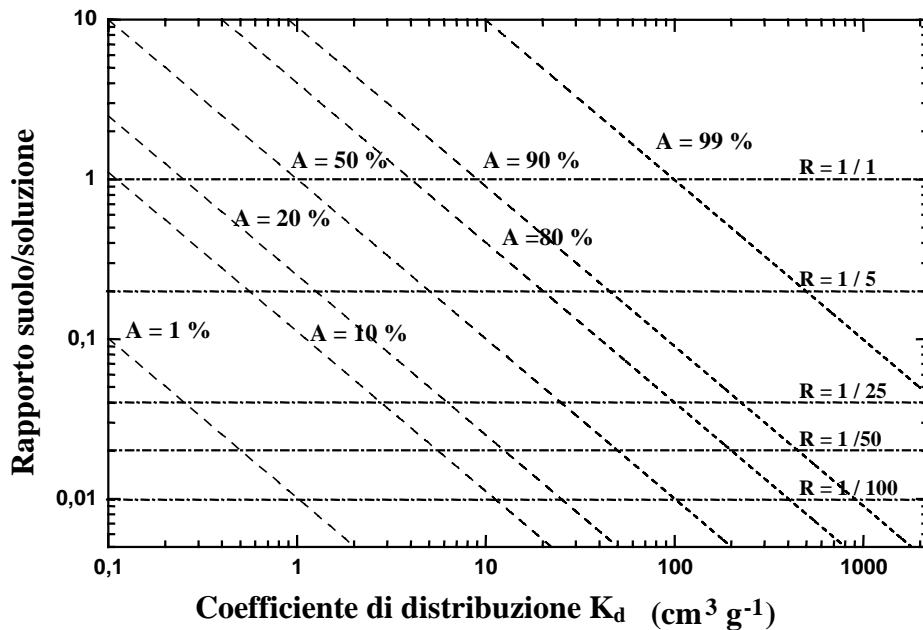


Fig. 1 Relazioni fra i valori di K_d e i vari rapporti terreno/soluzione, alle varie percentuali della sostanza sotto esame adsorbita

¹ $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$

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 K_d applicando tecniche di valutazione fondate, ad esempio, sui valori di P_{ow} (Allegato 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'allegato 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);
- 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 cm³ di soluzione di CaCl₂ 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 cm³ di CaCl₂ 0,01 M. Si aggiunge poi un certo volume della soluzione di riserva della sostanza sotto esame, fino a un totale di 50 cm³. Il volume di soluzione di riserva aggiunto: a) non deve eccedere il 10% dei 50 cm³ di volume della fase acquosa, per alterare il meno possibile la natura della soluzione di pre-equilibratura; b) deve condurre di preferenza a una 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 cm³ della soluzione di equilibratura di CaCl₂ 0,01 M (= 10% della soluzione di riserva rispetto a 50 cm³ 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 seguente esempio indica il modo di calcolare la concentrazione della soluzione di riserva (C_{st}). 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 cm³ della soluzione di equilibratura di CaCl₂ 0,01 M (= 10% della soluzione di riserva rispetto a 50 cm³ 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.

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 (Allegato 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 (es.: 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 (v. allegato 5, fig. 1)². Si calcola inoltre il valore di K_d all'equilibrio. Sulla base del valore di K_d ed utilizzando la fig.1 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'Allegato 5.

1.9.2.2. *Determinazione del tempo di equilibrizzazione 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'allegato 5 mostrano alcuni esempi di tali grafici. Il tempo di equilibrio è quello necessario perché il sistema raggiunga una piattaforma.

Se con un dato terreno non si raggiunge una piattaforma ma si ha un incremento continuo, la causa andrebbe cercata in certi fattori di complicità, 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 e/o volatilizzata e/o non estratta. Per un corretto bilancio di massa, l'equilibrio di adsorbimento dovrebbe essere stato raggiunto durante l'esperimento.

² Per valutare se la piattaforma di equilibrio è stata raggiunta si potrebbero impiegare anche i grafici della concentrazione della sostanza sotto esame nella fase acquosa (C_{aq}^{ads}) in funzione del tempo (cf allegato 5, fig. 2).

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'essere 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 90%, 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.

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 i 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 0,01M, 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 $K_d \leq 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ 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 $DT-50^3$ (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 $0,3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, 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).

³ DT-50: tempo di degradazione per il 50% della sostanza sotto esame .

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).

Nota bene: 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.

(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. Essa 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_2 (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_1}) e/o intervallo tempo ($D_{\Delta t_1}$), secondo le esigenze dello studio, e riportato graficamente in funzione del tempo. Si calcola anche il coefficiente di desorbimento K_{des} all'equilibrio. Tutte le equazioni applicabili sono riportate al capitolo "Presentazione dei dati e relazione", nonché nell'Allegato 5.

Risultati dell'esperimento sulla cinetica di desorbimento

I grafici comuni del desorbimento percentuale D_{t_1} e dell'adsorbimento percentuale A_{t_1} 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. Isotherme 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 Allegato 5).

2. PRESENTAZIONE DEI DATI E RELAZIONE

I dati analitici vanno presentati in forma tabulare (cfr. Allegato 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 1g. 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:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \quad (\%) \quad (3)$$

dove:

A_{t_i} = percentuale di adsorbimento al momento t_i (%);

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = 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'Allegato 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.

$$K_d = \frac{C_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (4)$$

dove:

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = contenuto della sostanza adsorbita sul terreno all'equilibrio di adsorbimento ($\mu\text{g g}^{-1}$);

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = concentrazione di massa della sostanza nella fase acquosa all'equilibrio di adsorbimento ($\mu\text{g cm}^{-3}$). Questa concentrazione viene determinata analiticamente tenendo conto dei valori indicati dai bianchi;

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = massa della sostanza adsorbita sul terreno all'equilibrio di adsorbimento (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = 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:

$$K_d = \frac{A_{\text{eq}}}{100 - A_{\text{eq}}} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (5)$$

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:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (6)$$

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 ($C_s^{ads}(eq)$), altrove indicato come x/m). Si parte dall'idea che l'equilibrio sia stato raggiunto e che $C_s^{ads}(eq)$ rappresenti il valore all'equilibrio:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{soil}} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (7)$$

L'equazione di adsorbimento secondo Freundlich è data dall'espressione:

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (8)$$

oppure, in forma lineare, dalla:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

dove:

K_F^{ads} = coefficiente di adsorbimento secondo Freundlich. Le sue dimensioni sono $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ soltanto se $1/n = 1$; in tutti gli altri casi, nelle dimensioni di K_F^{ads} ($\mu\text{g}^{-1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$) 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.

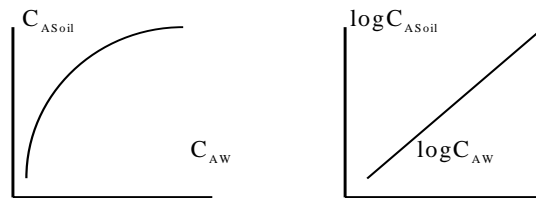


Fig. 2. Grafici di adsorbimento secondo Freundlich, normali e linearizzati

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:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \quad (\%) \quad (10)$$

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 ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$);

V_{rec} = volume del surnatante recuperato dopo l'equilibrio di adsorbimento ($1/\text{cm}^3$).

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:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (11)$$

dove:

D_{t_i} = percentuale di desorbimento al momento t_i (%);

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = 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'Allegato 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:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \cdot \frac{V_T}{m_{soil}} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (12)$$

dove:

K_{des} = coefficiente di desorbimento ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = 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 $m_{aq}^{des}(eq)$ figura nell'Allegato 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:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ si definisce come:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_F^F} - m_{aq}^A \quad (\mu g) \quad (14)$$

dove:

$C_s^{des}(eq)$ = contenuto della sostanza sotto esame che rimane adsorbito sul terreno all'equilibrio di desorbimento ($\mu g g^{-1}$);

$m_m^{des}(eq)$ = massa di sostanza determinata analiticamente nella fase acquosa all'equilibrio di desorbimento (μg);

m_{aq}^A = massa della sostanza sotto esame residua 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_F^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):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} \quad (\mu g g^{-1}) \quad (16)$$

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 ($\mu g cm^{-3}$).

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 $1/n$ 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 C_s 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;
 - 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 cationico (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'allegato 6 e presentazioni grafiche;
- tutte le informazioni e osservazioni che possono essere utili per interpretare i risultati delle prove.

RIFERIMENTI

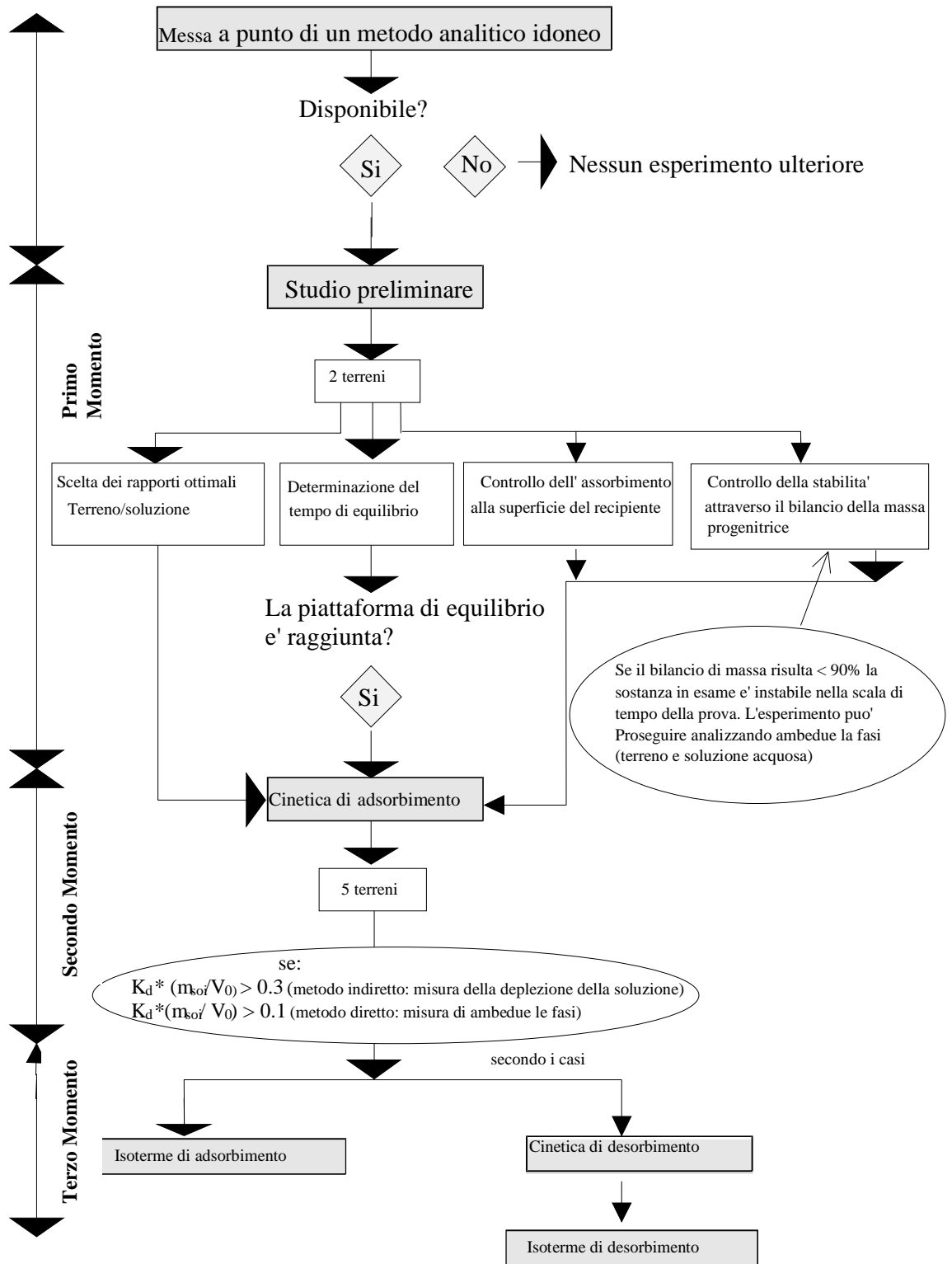
1. Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.
2. Fränze O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.
3. Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.
4. OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).
5. US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.
6. US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.
7. ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.
8. Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.
9. Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
10. Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.
11. 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), 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, 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, 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, 901-932.

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. Furninge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), "Persistence of herbicides in soil". J. Sci. Fd Agric., 18, 269-273.
23. Burkhard N., and Guth J.A., (1981), "Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption". Pestic. Sci. 12, 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, 961-971.
25. Osgerby J.M., (1973), "Process affecting herbicide action in soil". Pestic. Sci., 4, 247-258.
26. Guth J.A., (1972), "Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden". Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, 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, 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, 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, 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), 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, 340-350.
34. Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), "Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils". Pest. Sci., 11, 389-395.
35. Green R.E., and Karickhoff 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, 572-576.
37. Hance R.J., (1969), "An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils". J. Agri. Food Chem., 17, 667-668.
38. Briggs G.G. (1969), "Molecular structure of herbicides and their sorption by soils". Nature, 223, 1288.
39. Briggs G.G. (1981). "Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor". J. Agric. Food Chem., 29, 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, 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, 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. 32:222-234.
43. Karickhoff S.W., (1981) "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". Chemosphere 10, 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, 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. 19:67-69.

47. Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), "Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils". *Weed Science*, Vol. 23, 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, WI, 1982.
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, 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.*, 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, 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, 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), 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), 227-231.
66. Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), "Sorption of organic substances by soils and sediments". *J. Environm. Sci. Health*, B19 (3), 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), 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.
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, 831-832.

71. Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), "Sorption of *p*-Naphthol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption". *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, 38-42.
72. Karickhoff S.W., (1981), "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". *Chemosphere*, Vol. 10(8), 833-846.
73. Moreale A., van Bladel R., (1981), "Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité - réactivité. *Revue de l'Agric.*, 34 (4), 319-322.
74. Müller M., Kördel W. (1996), "Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil". *Chemosphere*, 32(12), 2493-2504.
75. Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), "HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - results of a ring test". *Chemosphere* 30 (7), 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), 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, 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.*, 3973-93.
82. Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980), "Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption". *Ann. Agron.* 31: 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, U.K.
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).

ALLEGATO 1
Schema di sperimentazione



ALLEGATO 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 ($m_0=110 \mu\text{g}$) e la massa all'equilibrio ($m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})=100\mu\text{g}$) 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 ($m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$) e del 52.4% nel calcolo del K_d .

$$\begin{array}{lcl} \text{Quantità di terreno} & m_{\text{soil}} & = 10 \text{ g} \\ \text{Volume di soluzione} & V_0 & = 100 \text{ cm}^3 \end{array}$$

	$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	R	$m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})^*$	$C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})^*$	R_{\ddagger}	K_d^*	R_{\ddagger}	
	(μg)	($\mu\text{g cm}^{-3}$)		(μg)	($\mu\text{g g}^{-1}$)				
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ or $C_0 = 1.100 \mu\text{g} / \text{cm}^3$	PER A = 9%								
	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%	
	$m_0 = 110 \mu\text{g}$ or $C_0 = 1.100 \mu\text{g} / \text{cm}^3$	PER A = 55%							
		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%
	$m_0 = 110 \mu\text{g}$ or $C_0 = 1.100 \mu\text{g} / \text{cm}^3$	PER A = 99%							
		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%	

$$* m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}), \quad C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{[C_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})] V_0}{m_{\text{soil}}}, \quad K_d = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \frac{V_0}{m_{\text{soil}}}$$

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = massa della sostanza sotto esame nella fase terreno all'equilibrio, μg ;

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = massa della sostanza sotto esame nella fase acquosa all'equilibrio, μg ;

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = contenuto della sostanza sotto esame nella fase terreno all'equilibrio, $\mu\text{g g}^{-1}$;

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = concentrazione in massa della sostanza sotto esame nella fase acquosa all'equilibrio, $\mu\text{g cm}^{-3}$;

R = errore analitico nella determinazione di $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$;

R^{\ddagger} = errore calcolato dovuto all'errore analitico R.

ALLEGATO 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:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad K_{om} = \frac{K_d}{1.724} \cdot \frac{100}{\%oc} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1})$$

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 v. (12) (68)].

Sostanza	Correlazioni	Autori
Uree sostituite	$\log K_{om} = 0.69 + 0.52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Clororganici aromatici	$\log K_{oc} = -0.779 + 0.904 \log P_{ow}$	Chiou <i>et al.</i> (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 v. (68) (69)].

Composti	Correlazioni	Autori
Antiparassitari diversi	$\log K_{om} = 3.8 - 0.561 \log S_w$	Gerstl e Mingelgrin (1984) (66)
Sostanze alifatiche e aromatiche clorate	$\log K_{om} = (4.040 \pm 0.038) - (0.557 \pm 0.012) \log S_w$	Chiou <i>et al.</i> (1979) (70)
α -naftolo	$\log K_{oc} = 4.273 - 0.686 \log S_w$	Hasset <i>et al.</i> (1981) (71)
Sostanze cicliche, alifatiche e aromatiche	$\log K_{oc} = -1.405 - 0.921 \log S_w - 0.00953 (\text{mp}-25)$	Karickhoff (1981) (72)
Composti vari	$\log K_{om} = 2.75 - 0.45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

ALLEGATO 4

CALCOLI PER LE 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, per semplificare, tutti i parametri sono espressi in unità non appartenenti al SI (g, cm).

$$t = \frac{9}{2} \left[\frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_s - \rho_{aq})} \right] \ln \left(\frac{R_b}{R_t} \right) \quad (1)$$

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 $\eta = 8.95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\rho_{aq} = 1.0 \text{ g.cm}^{-3}$.

Il tempo di centrifugazione si ricava quindi dall'equazione (2):

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

3. Dalla (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 rpm, il tempo di centrifugazione è di 240 min per una densità di 1,2 g cm³, ma scende a 50 min per una densità di 2,0 g cm³. 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.

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 colloidali. Le particelle colloidali, di diametro inferiore a $0,2 \mu\text{m}$, 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 colloidali 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 colloidali. In questo caso, per separare le tre fasi (terreno, colloidali, soluzione) si dovrebbe procedere a un'ultracentrifugazione a $60\,000 \text{ rpm}$ o un'ultrafiltrazione su filtri con pori da $100\,000$ dalton. La sostanza sotto esame va ricercata in tutte e tre le fasi, per ciò il protocollo di sperimentazione dovrebbe essere modificato di conseguenza.

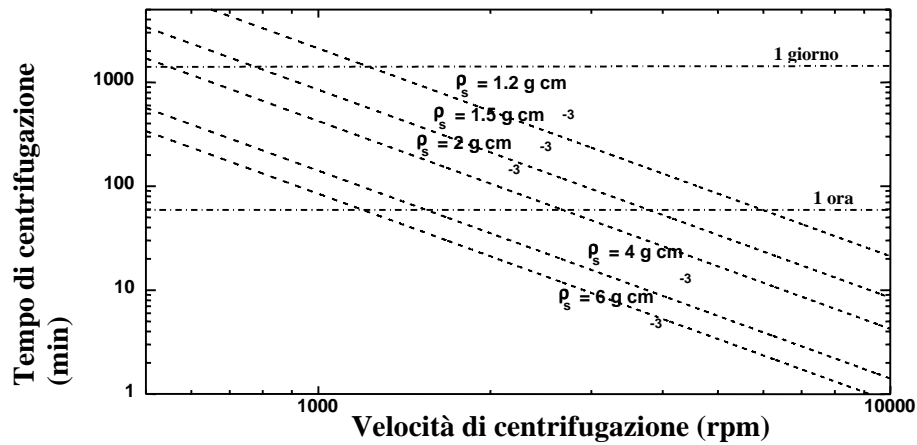


Fig. 1a. Variazione dei tempi di centrifugazione (t) in funzione della velocità di centrifugazione (rpm) per differenti densità (ρ_s) dei terreni ($R_t = 10 \text{ cm}$; $R_b - R_t = 10 \text{ cm}$; $\eta = 8.95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\rho_{aq} = 1.0 \text{ g.cm}^{-3}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$).

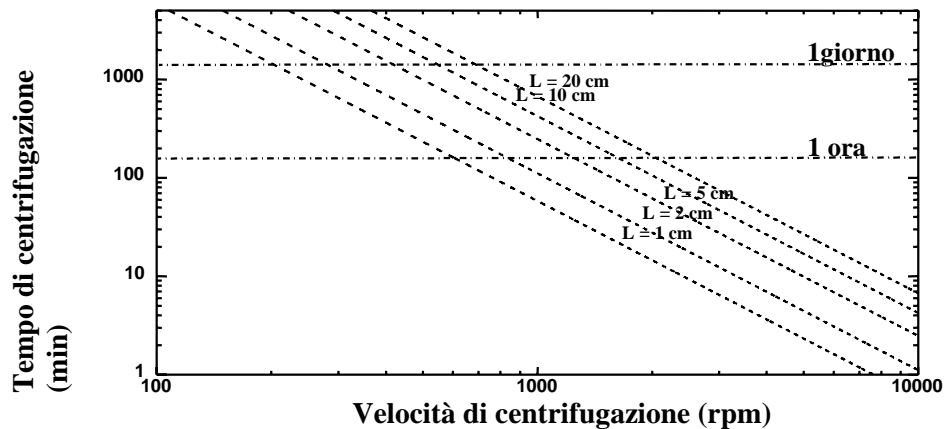
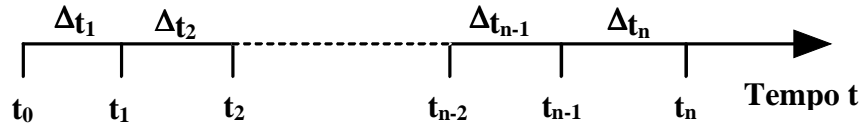


Fig. 1b. Variazione dei tempi di centrifugazione (t) in funzione della velocità di centrifugazione (rpm) per differenti altezze della miscela nella provetta ($R_b - R_t = L$; $R_t = 10 \text{ cm}$; $\eta = 8.95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\rho_{aq} = 1.0 \text{ g.cm}^{-3}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$; $\rho_s = 2.0 \text{ g cm}^{-3}$).

ALLEGATO 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 :

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \quad (\%) \quad (1)^4$$

I termini di quest'equazione possono essere calcolati come segue:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m_s^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (3)$$

dove:

A_{t_i} = percentuale di adsorbimento (%) all'attimo t_i ;

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = 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 ($\mu\text{g cm}^{-3}$);

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$ = concentrazione di massa della sostanza nella fase acquosa all'attimo t_i in cui l'analisi viene effettuata ($\mu\text{g cm}^{-3}$); 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 $C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$ 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.

⁴ Equazione applicabile tanto al metodo diretto quanto al metodo indiretto. Tutte le altre equazioni sono applicabili esclusivamente al metodo indiretto.

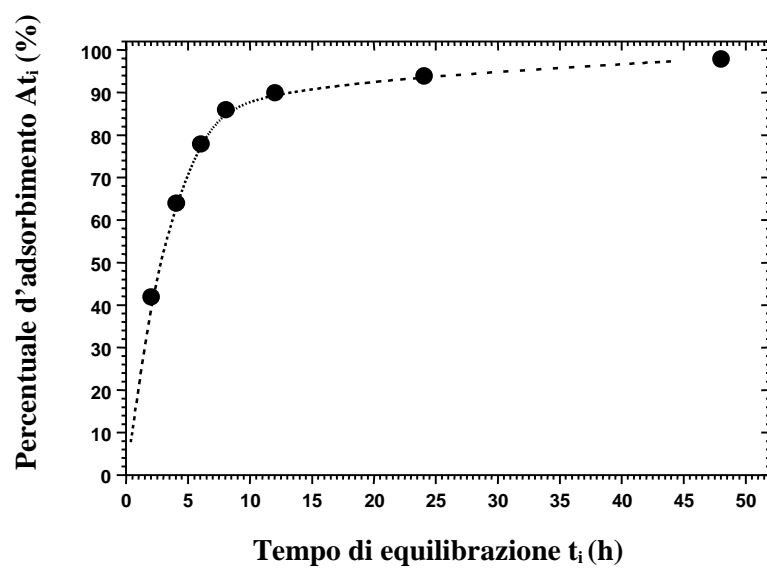


Fig. 1. Grafico di equilibrio all'adsorbimento

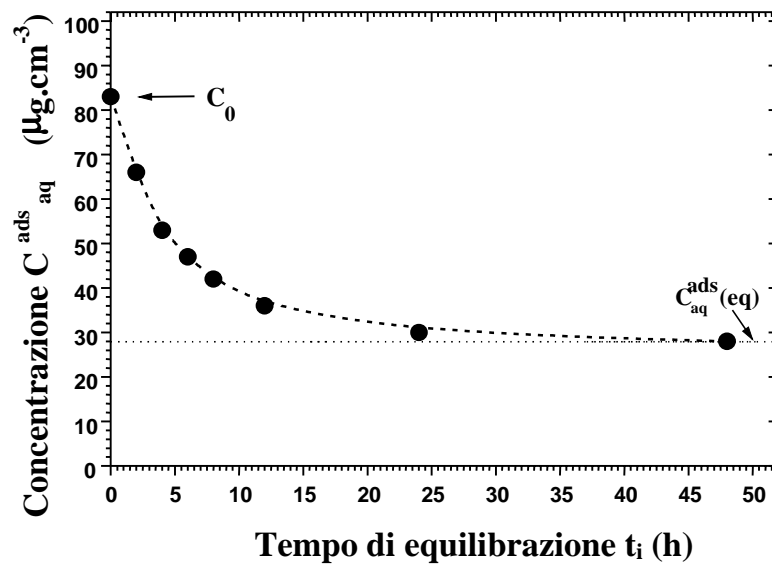


Fig.2. Concentrazione di massa della sostanza sotto esame nella fase acquosa (C_{aq}) in funzione del tempo

b) 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 $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) \quad (4)$$

- per il secondo intervallo di tempo $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (5)$$

- per il terzo intervallo di tempo $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_3) = m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

- per l'ennesimo intervallo di tempo $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n) = m_m^{\text{ads}}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

- La percentuale di adsorbimento ad ogni intervallo di tempo, $A_{\Delta t_i}$, si calcola con l'equazione seguente:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (8)^5$$

mentre la percentuale di adsorbimento (A_{t_i}) a un dato attimo t_i si ricava con l'equazione:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{\text{ads}}(j)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (9)^5$$

⁵ Equazioni applicabili tanto al metodo diretto quanto al metodo indiretto. Tutte le altre equazioni sono applicabili esclusivamente al metodo indiretto.

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:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)^5$$

- la massa della sostanza sotto esame nella soluzione è:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)^5$$

- la percentuale di adsorbimento all'equilibrio è:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (12)^5$$

I parametri sopra impiegati sono definiti come segue:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), \dots, m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = massa di sostanza adsorbita sul terreno, rispettivamente durante gli intervalli di tempo $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ (μg);

$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), \dots, m_m^{ads}(t_n)$ = massa della sostanza misurata in un'aliquota v_a^A , rispettivamente agli attimi t_1, t_2, \dots, 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);

$A_{\Delta t_i}$ = percentuale di adsorbimento corrispondente all'intervallo di tempo Δt_i (%);

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 0,01 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:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (15)$$

- durante l'intervallo di tempo (Δt_i), con l'equazione:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (16)$$

dove:

D_{t_i} = percentuale di desorbimento all'attimo t_i (%);

$D_{\Delta t_i}$ = percentuale di desorbimento corrispondente all'intervallo di tempo Δt_i (%);

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = massa della sostanza sotto esame desorbita all'attimo t_i (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ = 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_i 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);

$$m_{aq}^A = m_{ads}^{(eq)} \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = 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 (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_{t_i} 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 (cf punto 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:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \quad (18)$$

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:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) \quad (19);$$

- 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:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (20)$$

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, $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \quad e \quad m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— per il secondo intervallo di tempo, $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T} \right) \quad \text{and}$$

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2) \right] \quad (22)$$

— per l'ennesimo intervallo di tempo, $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \right]$$

$$e \quad m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \quad (23)$$

In conclusione, la percentuale $D_{\Delta t_i}$ di desorbimento per ciascun intervallo di tempo si calcola con l'equazione

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad , \quad (24)$$

dove la percentuale di desorbimento D_{t_i} all'attimo t_i è data dall'equazione:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (25)$$

dove i parametri sopra impiegati sono definiti come segue:

$m_s^{des}(\Delta t_1), m_s^{des}(\Delta t_2), \dots, m_s^{des}(\Delta t_n)$ = massa della sostanza che rimane rispettivamente adsorbita sul terreno dopo gli intervalli di tempo $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1), m_{aq}^{des}(\Delta t_2), \dots, m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = massa della sostanza di prova rispettivamente desorbita durante gli intervalli di tempo $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ (μg);

$m_m^{\text{des}}(t_1), m_m^{\text{des}}(t_2), \dots, m_m^{\text{des}}(t_n)$ = massa della sostanza rispettivamente misurata in un'aliquota (v_a^D) ai momenti t_1, t_2, \dots, 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_{aq}^A = massa della sostanza sotto esame rimasta dopo l'equilibrio di adsorbimento per effetto della sostituzione incompleta del volume, (μg);

$$m_{\text{aq}}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (26)$$

V_R = volume del surnatante allontanato dalla provetta dopo il raggiungimento dell'equilibrio di adsorbimento e sostituito 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);

$$v_a^D \leq 0.02 \cdot V_T \quad (27)$$

ALLEGATO 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 CaCl ₂	cm ³	
Concentrazione nominale soluzione finale	µg cm ⁻³	
Concentrazione analitica soluzione finale	µg 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

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					-	-
Concentrazione iniziale della sostanza in esame della fase acquosa		µg cm ⁻³						
Dopo agitazione e centrifugazione								
Concentrazione nella fase acquosa		µg 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	$m_{s_{oil}}$	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 equalibrazione	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.				
Concentraz. della sostanza in esame nel solvente	C_{E1}	$\mu g\ cm^{-3}$				
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.				
Concentraz. della sostanza in esame nel solvente	C_{E2}	$\mu g\ cm^{-3}$				
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					
Bilancio di massa	MB	%				

Sostanza esaminata:

Suolo esaminato:

Contenuto in sostanza secca del suolo (105 °C, 12 h):.....%

Temperatura:.....°C

Isoterme di adsorbimento

	Simbolo	Unita`								
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 $CaCl_2$ 0,01 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 concentraz.	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Tempo di equilibrio	-	h								
Dopo agitazione e centrifugazione										
Concentrazione della sostanza nella fase acquosa, compresa la correzione per il bianco	$C_{aq}^{ads}\ (eq)$	$\mu g\ cm^{-3}$								
Temperatura		°C								
Massa adsorbita per unita` di suolo	$C_s^{ads}\ (eq)$	$\mu g\ g^{-1}$								

Analisi di regressione:

valore di K_F^{ads} :

valore di l/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 In parallelo 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_T^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				
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

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 (2000) 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 C18. 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 equilibrio 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. la sezione 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 $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$. Il valore di K_d può variare in base alle proprietà di adsorbimento e col variare della concentrazione.

$$K_d = \frac{C_{suolo} \text{ o } C_{fango}}{C_{aq}} \quad (1)$$

dove:

C_{suolo} = concentrazione della sostanza in esame nel terreno all'equilibrio ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

C_{fango} = concentrazione della sostanza in esame nel fango all'equilibrio ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

C_{aq} = concentrazione della sostanza in esame nella fase acquosa all'equilibrio ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

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 µg·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

1/n = pendenza dell'isoterma di adsorbimento di Freundlich

C_{aq} = concentrazione della sostanza in esame nella fase acquosa all'equilibrio (µg · ml⁻¹)

$$\text{A } C_{aq} = 1; \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

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 ml · g⁻¹ o µg · g⁻¹ di sostanza organica.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} \text{ (valore adimensionale o in ml} \cdot \text{g}^{-1}\text{)} \text{ o } \frac{K_f}{f_{oc}} \text{ (}\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{)} \quad (3)$$

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)

t₀ : tempo morto in HPLC (minuti) (cfr. la sezione 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 un valore adimensionale.

$$P_{ow} = \frac{C_{\text{ottanolo}}}{C_{aq}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

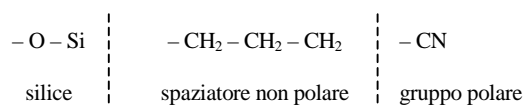
1.3 SOSTANZE DI RIFERIMENTO

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.

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'allegato. 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:



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} .

Il metodo per HPLC è applicabile a sostanze chimiche (marcate o non marcate) per cui è disponibile un sistema di rilevazione adeguato (ad es. 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 es. 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.

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'allegato ed è stato anche applicato ad una serie di sostanze delle seguenti classi chimiche:

- ammine aromatiche (ad es. trifluralin, 4-cloroanilina, 3,5-dinitroanilina, 4-metilnilina, N-metilnilina, 1-naftilammina);
- esteri degli acidi carbossilici aromatici (ad es. estere metilico dell'acido benzoico, estere etilico dell'acido 3,5-dinitrobenzoico);
- idrocarburi aromatici (ad es. toluene, xilene, etilbenzene, nitrobenzene);
- esteri dell'acido arilossifenossipropionico (ad es. diclofop-metile, fenoxaprop-etile, fenoxaprop-P-etile);
- fungicidi a base di benzimidazolo e imidazolo (ad es. carbendazim, fuberidazole, triazoxide);
- ammidi degli acidi carbossilici (e.g. 2-clorobenzammide, N,N-dimetilbenzammide, 3,5-dinitrobenzammide, N-metilbenzammide, 2-nitrobenzammide, 3-nitrobenzammide);
- idrocarburi clorurati (ad es. endosulfan, DDT, esaclorobenzene, quintozene, 1,2,3-triclorobenzene);
- insetticidi organofosforati (ad es. azinfos-metile, disulfoton, fenamifos, isofenfos, pirazofos, sulprofos, triazofos);
- fenoli (ad es. fenolo, 2-nitrofenolo, 4-nitrofenolo, pentaclorofenolo, 2,4,6-triclorofenolo, 1-naftolo);
- derivati della fenilurea (ad es. isoproturon, monolinuron, pencicuron);
- coloranti di pigmentazione (ad es. Giallo Acido 219, Blu Basico 41, Rosso Diretto 81);
- idrocarburi poliaromatici (ad es. acenaftene, naftalene);
- erbicidi a base di 1,3,5-triazina (ad es. prometryn, propazina, simazina, terbutrin);
- derivati del triazolo (e.g. 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 (per 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 e 5,0. 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.

1.6 CRITERI QUALITATIVI

1.6.1 Accuratezza

Normalmente la stima del coefficiente di adsorbimento può raggiungere una precisione di $\pm 0,5$ unità logaritmiche del valore determinato con il metodo di equilibrio in batch (cfr. la tabella 1 nell'allegato). 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'allegato.

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

È 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 es. 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 0,01M a pH 6,0 (55/45% v/v)

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_0**

Il tempo morto t_0 può essere determinato con due metodi diversi (cfr. anche la sezione 1.2).

1.8.2.1 *Determinazione del tempo morto t_0 mediante serie omologa*

È comprovato che con questa procedura i valori di t_0 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_0 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 nella sezione 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.

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_0 e dai tempi di ritenzione t_R delle sostanze di riferimento selezionate secondo l'equazione 4 (cfr. la sezione 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'allegato. 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 $\log K_{oc}$ 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 es. 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, chapt. 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, 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, 227-231.
- (5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, 297-312.
- (6) C.T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, 831-832.
- (7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, 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), 121-128.
- (9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), 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), 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, 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), 1373-1384.

ALLEGATO

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_{oc} 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), 121 - 128.

² W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, *35* (1/2), 107 – 119.

Tabella 2

Risultati di un test comparativo fra laboratori (11 laboratori partecipanti) eseguito per migliorare e validare il metodo per HPLC¹

Sostanza	N. CAS	log K_{oc} [OCSE 106]	K_{oc}	log K_{oc}
			[metodo per HPLC]	
Atrazina	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapenthenol	77608-88-3	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), 1373-1384.

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)	26850-47-5 12270-13-2	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 01 044 (1994).

/b/ B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285-304.

/c/ Dati forniti dalle industrie.

C.20 PROVA DI RIPRODUZIONE CON *DAPHNIA MAGNA*

1. METODO

Questo metodo di test della tossicità per la riproduzione corrisponde al TG 211 (1998) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Il principale obiettivo del test è valutare l'effetto delle sostanze chimiche sulla capacità riproduttiva di *Daphnia magna*.

1.2 DEFINIZIONI E UNITÀ

Animali riproduttori: femmine di *Daphnia* presenti all'inizio del test la cui capacità riproduttiva è oggetto dello studio.

Prole: piccoli di *Daphnia* prodotti dagli animali riproduttori nel corso del test.

Minima concentrazione con effetti significativi (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): concentrazione più bassa testata della sostanza alla quale si osserva un effetto statisticamente significativo ($p < 0,05$) sulla riproduzione e sulla mortalità parentale rispetto ai controlli, entro un periodo di esposizione definito. Tuttavia, tutte le concentrazioni al di sopra della 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).

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 ($p < 0,05$), entro un periodo di esposizione definito.

EC_x: concentrazione della sostanza di prova disciolta in acqua che provoca una percentuale x di riduzione della capacità riproduttiva di *Daphnia magna* entro un determinato periodo di esposizione.

Tasso intrinseco di accrescimento: misura della crescita della popolazione che integra la capacità riproduttiva e la mortalità specifica in base all'età (20) (21) (22). 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 rivelabilità: concentrazione minima che può essere individuata ma non quantificata.

Limite di determinazione: concentrazione minima misurabile quantitativamente.

Mortalità: si considerano morti gli animali che, entro 15 secondi dopo lieve agitazione del contenitore usato per il test, 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).

1.3 PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA

Giovani femmine di *Daphnia* (animali riproduttori), di età inferiore alle 24 ore al momento dell'inizio del test, vengono esposte alla sostanza di prova aggiunta ad acqua a un intervallo di concentrazioni diverse. La durata del test è di 21 giorni. Alla fine del test si valuta il numero totale di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore vivo alla fine del test. Ciò significa che la prole nata da adulti che muoiono durante il test viene esclusa dai calcoli. 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 prodotti da ciascun genitore vivo alla fine del test. La capacità riproduttiva degli animali esposti alla sostanza di prova viene confrontata con quella del/i controllo/i allo scopo di determinare la concentrazione più bassa alla quale si osservano effetti (LOEC) e quindi la concentrazione a cui non si osservano effetti (NOEC). Inoltre, e per quanto possibile, si analizzano i dati mediante un modello di regressione allo scopo di calcolare la concentrazione che causerebbe una riduzione percentuale x della capacità riproduttiva (cioè CE_{50} , CE_{20} o CE_{10}).

Deve essere inoltre riportata la sopravvivenza degli animali riproduttori e il tempo intercorso fino alla produzione della prima schiusa. È possibile esaminare anche altri effetti correlati alla sostanza su parametri quali la crescita (ad esempio la lunghezza) e il tasso intrinseco di accrescimento.

1.4 INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA DI PROVA

Dovrebbero essere disponibili i risultati di un test di tossicità acuta (vedi Metodo C.2, parte I) effettuato sulla *Daphnia magna*. Tali risultati possono essere utili per selezionare un intervallo di concentrazione adeguato da utilizzare nei test sulla riproduzione. Dovrebbero essere noti la solubilità in acqua e la tensione di vapore della sostanza di prova e dovrebbe essere disponibile un metodo analitico affidabile per quantificare la sostanza nelle soluzioni di prova con la relativa efficienza di recupero e limite di determinazione.

Le informazioni sulla sostanza in esame utili per definire le condizioni di esecuzione del test sono: formula di struttura, purezza della sostanza, fotostabilità, stabilità nelle condizioni di esecuzione del test, pK_a , P_{ow} e risultati del test di biodegradabilità immediata (vedi Metodo C.4).

1.5 VALIDITÀ DEL TEST

Perché il test sia valido, il/i controllo/i dovrebbe/ro soddisfare i seguenti criteri di prestazione:

- la mortalità degli animali riproduttori (femmine di *Daphnia*) non deve superare il 20 % alla fine del test;
- il numero medio dei piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore sopravvissuto alla fine del test deve essere ≥ 60 .

1.6 DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

1.6.1 **Apparecchiatura**

I recipienti di prova e le altre apparecchiature destinate a entrare in contatto con le soluzioni della prova devono essere interamente di vetro o di altro materiale chimicamente inerte. Di norma si utilizzano beaker di vetro come recipienti di prova.

Occorrono inoltre alcuni (o tutti) dei seguenti strumenti :

- misuratore di ossigeno (con microelettrodo o altro apparecchio adatto per la misurazione dell'ossigeno disciolto in campioni di volume ridotto);
- adeguata apparecchiatura per il controllo della temperatura;
- pHmetro;
- apparecchiatura per la determinazione della durezza dell'acqua;
- apparecchiatura per la determinazione della concentrazione del carbonio organico totale (TOC) nell'acqua o per la determinazione della domanda chimica di ossigeno (COD);

- adeguata apparecchiatura per il controllo del regime di illuminazione e la misurazione dell'intensità della luce.

1.6.2 Organismi da utilizzare nella prova

La specie da utilizzare nel test è la *Daphnia magna* Straus. È possibile usare altre specie di dafnie, purché soddisfino adeguatamente i criteri di validità (il criterio di validità relativo alla capacità riproduttiva nei controlli deve essere calibrato sulla specie di dafnia). Nel caso si utilizzino altre specie di dafnie, occorre identificarle con precisione e motivare la scelta.

Di preferenza il clone dovrebbe essere stato identificato tramite determinazione del genotipo. La ricerca (1) ha dimostrato che le prestazioni riproduttive del Clone A (proveniente dall'IRCHA, in Francia) (3), allevato nelle condizioni descritte nel presente metodo, soddisfa costantemente il criterio di validità di una media di ≥ 60 di piccoli per animale riproduttore sopravvissuto. Sono comunque accettabili altri cloni, purché si dimostri che la coltura di *Daphnia* soddisfa i criteri di validità del test.

All'inizio del test gli animali devono avere meno di 24 ore di vita e non devono provenire dalla prima nidiata. Devono provenire da un allevamento sano (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.). Gli animali riproduttori vanno mantenuti in condizioni di allevamento (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 delle dafnie da usare nel test è diverso da quello utilizzato di routine per la coltura delle dafnie, è buona prassi prevedere un periodo di acclimatazione prima del test, normalmente di 3 settimane (cioè una generazione) per evitare di sottoporre a stress gli animali destinati alla riproduzione.

1.6.3 Mezzo di prova

Si raccomanda di usare per questa prova un mezzo completamente definito per evitare l'uso di additivi (ad esempio alghe, estratto di terra, e così via), che sono difficili da caratterizzare, e dunque aumentare la possibilità di standardizzazione fra vari laboratori. I mezzi M4 (4) e M7 di Elendt (vedi allegato 1) si sono rivelati adatti a questo scopo. Sono comunque accettabili altri mezzi (ad es. (5) (6)), purché si dimostri che le prestazioni della coltura di *Daphnia* soddisfano i criteri di validità del test.

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 che i livelli di TOC nel mezzo (cioè prima dell'aggiunta delle alghe) siano inferiori a 2 mg/l (7).

Quando si provano sostanze 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 in esame. Per questo motivo è consigliabile avere un mezzo completamente definito. Attualmente però gli unici mezzi di questo tipo noti per essere adatti all'allevamento 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 il test di sostanze contenenti metalli; occorre inoltre evitare anche altri mezzi che contengono agenti chelanti. Per le sostanze contenenti metalli può essere consigliabile utilizzare un mezzo alternativo come, ad esempio, l'acqua dolce dura ricostituita secondo le indicazioni dell'ASTM (7), che non contiene EDTA, con l'aggiunta di estratto di alghe marine (8). Questa combinazione di acqua dolce dura ricostituita ed estratto di alghe marine è adatta anche per l'allevamento a lungo termine e la sperimentazione con *Daphnia magna* (2), sebbene anch'essa eserciti un'azione lievemente chelante a causa del componente organico presente nell'estratto di alghe marine aggiunto.

All'inizio e nel corso del test la concentrazione dell'ossigeno disciolto deve essere superiore a 3 mg/l. Il pH dovrebbe restare nel range 6-9 senza di norma variare di oltre 1,5 unità nell'ambito di un test. Si raccomanda una durezza superiore a 140 mg/l (come CaCO_3). I test eseguiti con un valore pari o superiore a questo livello hanno dimostrato che le prestazioni riproduttive sono conformi ai criteri di validità (9) (10).

1.6.4 Soluzioni di prova

Le soluzioni di prova alle concentrazioni scelte vanno in genere preparate per diluizione di una soluzione madre. Le soluzioni madre dovrebbero preferibilmente essere preparate solubilizzando la sostanza nel mezzo di prova.

Per produrre una soluzione madre alla concentrazione adeguata, talvolta è necessario aggiungere solventi organici o disperdenti, ma l'uso di queste sostanze dovrebbe essere evitato per quanto possibile. Alcuni solventi adatti sono ad esempio l'acetone, l'etanolo, il metanolo, la dimetilformammide e il glicole trietilenico. Alcuni disperdenti adatti sono ad esempio il Cremophor RH40, la metilcellulosa 0,01 % e l'HCO-40. In ogni caso nelle soluzioni di prova la sostanza da saggiare non deve eccedere il limite di solubilità nel mezzo di prova.

Solventi: servono per produrre una soluzione madre che possa essere dosata con precisione nell'acqua. Alla concentrazione di solvente raccomandata nel mezzo di prova finale ($\leq 0,1$ ml/l) i solventi sopra elencati non sono tossici e non aumentano la solubilità in acqua delle sostanze.

Disperdenti: possono facilitare il dosaggio preciso e la dispersione. Alla concentrazione raccomandata nel mezzo di prova finale ($\leq 0,1$ ml/l) i disperdenti sopra elencati non sono tossici e non aumentano la solubilità in acqua delle sostanze.

1.7 DISEGNO SPERIMENTALE

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, non si può escludere che alcuni effetti collegati al tempo (ad es. la stanchezza dell'operatore o un altro errore) possono produrre effetti maggiori alle concentrazioni più alte. Inoltre, se si ritiene possibile una alterazione dei risultati del test a causa delle condizioni sperimentali iniziali o ambientali (ad es. la posizione delle vasche nel laboratorio), si può ricorrere al frazionamento del test in blocchi.

1.8 PROCEDURA

1.8.1 Condizioni di esposizione

1.8.1.1 Durata

La durata del test è di 21 giorni.

1.8.1.2 Carico

Gli esemplari riproduttori vengono mantenuti individualmente, uno per ciascun recipiente di prova, con 50-100 ml di mezzo in ogni recipiente.

Talvolta, per soddisfare i requisiti della procedura analitica usata per determinare la concentrazione della sostanza 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 alle dafnie per assicurare un'adeguata disponibilità del cibo e il rispetto dei criteri di validità. Per i test a flusso continuo è possibile prendere in considerazione, per motivi tecnici, disegni sperimentali alternativi (ad esempio quattro gruppi di 10 animali in una soluzione di prova più abbondante); qualunque modifica del disegno sperimentale deve essere descritta nella relazione.

1.8.1.3 *Numero di animali*

Per i test semistatici occorrono almeno 10 animali, mantenuti singolarmente, per ogni concentrazione di prova e almeno 10 animali, mantenuti singolarmente nella serie di controllo.

È stato dimostrato che per i test 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 i test nei quali gli animali sono tenuti in gruppi, se gli animali riproduttori muoiono, non è possibile esprimere la capacità riproduttiva in termini di numero totale di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore vivo alla fine del test. In questi casi la capacità riproduttiva dovrebbe essere espressa come 'numero totale di piccoli vivi prodotti per (pro)genitore presente all'inizio del test'.

1.8.1.4 *Alimentazione*

Nei test semistatici è preferibile nutrire gli animali ogni giorno, e comunque almeno tre volte alla settimana (in concomitanza con la sostituzione del mezzo). Se non si osserva questo modello di alimentazione, (per esempio nei saggi a flusso continuo) occorre segnalarlo nella relazione.

Durante la prova la dieta degli animali riproduttori dovrebbe consistere preferibilmente in alghe unicellulari vive di una o più delle seguenti specie: *Chlorella* sp, *Selenastrum capricornutum* (ora *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)) e *Scenedesmus subspicatus*. La dieta deve essere basata sulla quantità di carbonio organico (C) fornita a ciascun animale riproduttore. Ricerche (12) hanno dimostrato che per ottenere il numero di piccoli di *Daphnia magna* necessari per soddisfare i criteri di validità 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 del test oppure una razione inferiore all'inizio della prova del test ed una razione più alta durante la prova, tenendo conto della crescita degli animali riproduttori. In questo caso la razione deve comunque restare sempre nel range 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. allegato 2 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 l'assorbanza della luce è un parametro alternativo al contenuto di carbonio migliore rispetto al numero di cellule (13).

Occorre alimentare le dafnie 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 avviene per centrifugazione con successiva risospensione in acqua distillata, acqua deionizzata o mezzo di allevamento delle dafnie.

1.8.1.5 *Luce*

16 ore di luce a un'intensità non superiore a $15-20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

1.8.1.6 *Temperatura*

La temperatura dei mezzi di prova dovrebbe rimanere tra i 18 e i 22°C e possibilmente non variare di oltre 2°C in ogni test, restando comunque entro i suddetti limiti (ad esempio 18-20, 19-21 o 20-22°C). Per controllare la temperatura si può utilizzare un recipiente di prova aggiuntivo.

1.8.1.7 *Aerazione*

I recipienti di prova non devono essere aerati durante il test.

1.8.2 Concentrazioni di prova

In genere si dovrebbero provare almeno cinque concentrazioni di prova, disposte in serie geometriche e separate da un fattore preferibilmente non superiore a 3,2; per ogni concentrazione si dovrebbe allestire un numero adeguato di repliche (cfr. sezione 1.8.1.3). Se si utilizzano meno di cinque concentrazioni occorre indicare il motivo. Le sostanze non vanno provate al di sopra del loro limite di solubilità nel mezzo di prova.

Nel definire l'intervallo delle concentrazioni è necessario tenere conto dei seguenti elementi:

- i. Se l'obiettivo è ottenere la LOEC/NOEC, la concentrazione minima deve essere sufficientemente bassa affinché la fecondità, a tale concentrazione, non sia significativamente inferiore rispetto a quella del controllo. In caso contrario il test andrà ripetuto con una concentrazione minima più bassa.
- ii. Se l'obiettivo è ottenere la LOEC/NOEC, la concentrazione massima deve essere sufficientemente alta affinché la fecondità, a tale concentrazione, sia significativamente inferiore rispetto a quella del controllo. In caso contrario il test andrà ripetuto con una concentrazione massima più elevata.
- iii. Se si stima la CE_x per gli effetti sulla riproduzione, è consigliabile usare un numero sufficiente di concentrazioni tale da consentire di definire la CE_x con un livello di confidenza adeguato. Se si stima la CE_{50} per gli effetti sulla riproduzione, è consigliabile che la massima concentrazione di prova sia maggiore della CE_{50} calcolata. Diversamente, sebbene sia comunque possibile calcolare la CE_{50} , l'intervallo fiduciale per la CE_{50} sarà molto ampio e potrebbe non essere possibile valutare in modo soddisfacente l'adeguatezza del modello adattato.
- iv. È preferibile che l'intervallo delle concentrazioni di prova non comprenda concentrazioni con un effetto statisticamente significativo sulla sopravvivenza degli adulti, in quanto ciò trasformerebbe la natura della prova da una semplice prova sulla riproduzione a una prova combinata su riproduzione e mortalità, che richiederebbe un'analisi statistica molto più complessa.

Le informazioni disponibili sulla tossicità della sostanza di prova (ad esempio risultati di prove di tossicità acuta e/o di studi di definizione dell'intervallo di concentrazione) dovrebbero essere di aiuto nella scelta delle concentrazioni di prova appropriate.

Se per facilitare la preparazione delle soluzioni di prova si utilizza un solvente o un disperdente (cfr. sezione 1.6.4), la sua concentrazione finale nei recipienti di prova non dovrebbe superare 0,1 ml/l e dovrebbe essere uguale in tutti i recipienti.

1.8.3 Controlli

In aggiunta alle concentrazioni con la sostanza di prova, 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 di prova. Anche per i controlli dovrebbe essere usato un numero adeguato di repliche (vedi sezione 1.8.1.3).

Generalmente, in un test ben condotto, il coefficiente di variazione del numero medio di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore nel/i controllo/i dovrebbe essere $\leq 25\%$; il coefficiente di variazione dovrebbe essere riportato per le prove dove gli animali riproduttori sono mantenuti individualmente.

1.8.4 Rinnovo del mezzo di prova

La frequenza con cui il mezzo viene rinnovato dipende dalla stabilità della sostanza di prova, ma dovrebbe essere almeno tre volte alla settimana. Se da prove preliminari sulla stabilità (cfr. sezione 1.4) la concentrazione della sostanza di prova non risulta stabile (cioè è al di fuori del range dell'80 - 120 % della concentrazione nominale o al di sotto dell'80 % della concentrazione iniziale misurata) durante il periodo massimo di rinnovo (3 giorni), si consiglia di rinnovare il mezzo con maggiore frequenza oppure di eseguire una prova a flusso continuo.

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 dafnie dovrebbe essere il più piccolo possibile.

1.8.5 **Osservazioni**

I risultati delle osservazioni fatte durante il test vanno registrati su apposite schede di raccolta dei dati (cfr. allegati 3 e 4). Dovendo fornire i dati di altre misurazioni (vedi 1.3 e 1.8.8) possono essere richieste ulteriori osservazioni.

1.8.6 **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'adulto. Ai fini del metodo qui descritto è necessario contare solo il numero di piccoli vivi, ma è consigliabile registrare anche la presenza di uova abortite o piccoli morti.

1.8.7 **Mortalità**

La mortalità fra gli animali riproduttori va rilevata di preferenza quotidianamente, almeno ad ogni conta dei piccoli.

1.8.8 **Altri parametri**

Sebbene questo metodo sia fondamentalmente inteso a valutare gli effetti sulla riproduzione, è possibile che altri effetti siano sufficientemente quantificati da permettere un'analisi statistica. La misura della crescita è molto auspicabile in quanto fornisce informazioni su possibili effetti subletali, che potrebbero essere più utili della 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 o efippi e il tasso intrinseco di aumento della popolazione.

1.8.9 **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 e vecchi, nel/i controllo/i e nella concentrazione massima della sostanza in esame.

Durante la prova le concentrazioni della sostanza di prova vanno determinate a intervalli regolari. Nei test semistatici in cui si prevede che la concentrazione della sostanza in esame resti intorno a $\pm 20\%$ del valore nominale (e cioè entro l'intervallo dell'80 - 120 %; cfr. sezioni 1.4. e 1.8.4), si raccomanda di analizzare 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, preparata di fresco e al momento di rinnovarla). Queste determinazioni vanno poi ripetute a intervalli almeno settimanali.

Per i test in cui non si prevede che la concentrazione della sostanza in esame resti entro $\pm 20\%$ del valore nominale, è necessario analizzare tutte le concentrazioni di prova, appena preparate e al momento di rinnovarle. Tuttavia, per i test in cui la concentrazione iniziale misurata della sostanza di prova non è entro $\pm 20\%$ 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 del test le determinazioni chimiche possono limitarsi alle concentrazioni massima e minima. In tutti i casi la determinazione delle concentrazioni della sostanza in esame prima del rinnovo può limitarsi ad un unico recipiente per ciascuna concentrazione.

Per i test a flusso continuo è appropriato l'uso di un regime di campionamento simile a quello descritto per i test semistatici (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 di prova.

Potendo dimostrare che durante tutto il test la concentrazione della sostanza di prova in soluzione è stata mantenuta in modo soddisfacente entro $\pm 20\%$ 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 di $\pm 20\%$, i risultati vanno espressi come media ponderata nel tempo (vedi allegato 5).

2. DATI E RELAZIONE

2.1 ELABORAZIONE DEI RISULTATI

Scopo di questo test è determinare l'effetto della sostanza di prova sul numero complessivo di piccoli vivi prodotti da ciascun animale riproduttore vivo alla fine del test. Occorre calcolare il numero complessivo di piccoli per animale riproduttore per ciascun recipiente di prova (replica). Se in una replica qualsiasi l'animale riproduttore muore durante il test o si rivela essere un maschio, questa replica viene esclusa dall'analisi. L'analisi si baserà quindi su un numero ridotto di repliche.

Per stimare la LOEC e quindi la NOEC per gli effetti della sostanza chimica sulla capacità riproduttiva è necessario calcolare la capacità riproduttiva media nelle varie repliche di ciascuna concentrazione, nonché la deviazione standard residua di dati comuni ("pooled"), utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA). La media di ogni concentrazione deve poi essere confrontata con la media dei controlli mediante un metodo adeguato di comparazione multipla. Possono essere utilizzati i test di Dunnett o di Williams (14)(15)(16)(17). È necessario controllare se la assunzione di omogeneità della varianza dell'ANOVA è fondata. Si raccomanda di fare questo controllo graficamente piuttosto che con un test formale della significatività (18); una possibile alternativa è il test di Bartlett. Se la assunzione non è fondata, bisogna valutare se trasformare i dati per omogeneizzare le varianze prima di eseguire l'ANOVA, o se eseguire una ANOVA ponderata. Occorre calcolare e riferire nella relazione l'entità dell'effetto misurabile tramite ANOVA (ovvero la più piccola differenza significativa).

Per la stima della concentrazione che causerebbe una riduzione del 50% della capacità riproduttiva (CE_{50}) è necessario approssimare ai dati una curva adeguata, come la curva logistica, utilizzando un metodo statistico come quello dei minimi quadrati. È possibile parametrizzare la curva in modo da poter stimare direttamente la CE_{50} e il suo errore standard. Ciò faciliterebbe notevolmente il calcolo dei limiti fiduciali della CE_{50} . A meno che vi siano buoni motivi per preferire limiti fiduciali diversi, vanno utilizzati i limiti di confidenza inferiore e superiore (probabilità del 95%). La procedura di approssimazione deve fornire, di preferenza, uno strumento per valutare il significato della mancanza di approssimazione. Lo si può fare graficamente o dividendo la somma residua dei quadrati in componenti di 'mancanza di adattamento e 'componenti d'errore puro' ed eseguendo un test della significatività per la mancanza di adattamento. Poiché generalmente i trattamenti che danno alta fecondità tendono ad avere una varianza maggiore nel numero dei piccoli prodotti rispetto ai trattamenti che danno bassa fecondità, si potrebbe eventualmente ponderare i valori osservati per rispecchiare le diverse varianze nei diversi gruppi di trattamento (vedi rif. 18 per ulteriori dettagli).

Nell'analisi dei dati ottenuti nel "ring test" finale (2) è stata approssimata una curva logistica mediante il seguente modello, sebbene si possano usare altri modelli adeguati:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

dove:

Y: numero totale dei piccoli per animale riproduttore vivo alla fine del test (calcolato per ciascun recipiente)

x: concentrazione della sostanza

c: numero previsto di piccoli se $x=0$

x_0 : CE_{50} della popolazione

b: parametro della pendenza

Questo modello dovrebbe essere adeguato in molte situazioni diverse, ma esistono senz'altro test per i quali non è adatto. È dunque necessario controllarne la validità come suggerito sopra. In alcuni casi può prestarsi meglio un modello di ormesi in cui concentrazioni basse danno effetti più severi (19).

È possibile calcolare anche altre Concentrazioni Efficaci, come la CE_{10} o la CE_{20} , anche se può essere preferibile utilizzare una parametrizzazione diversa del modello rispetto a quella usata per la stima della CE_{50} .

2.2 RELAZIONE SUL TEST

La relazione sul test deve contenere:

2.2.1 Sostanza di prova:

- natura fisica e proprietà fisico-chimiche pertinenti;
- dati di identificazione chimica, compresa la purezza.

2.2.2 Specie di prova:

- clone (se è stato tipizzato geneticamente), fornitore o fonte (se nota) e condizioni di utilizzate. Se si usa una specie diversa dalla *Daphnia magna*, è necessario precisarlo nella relazione e giustificare i motivi di questa scelta.

2.2.3 Condizioni di esecuzione della prova:

- procedura usata (ad es. 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 allevamento 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 alghe e, se noti, il ceppo e le condizioni di coltura);
- metodo di preparazione delle soluzioni madri e frequenza di rinnovo (deve essere specificato il tipo e la concentrazione del solvente o disperdente, se usati).

2.2.4

Risultati:

- risultati di eventuali studi preliminari sulla stabilità della sostanza di prova;
- concentrazioni di prova nominali e risultati di tutte le analisi per determinare la concentrazione della sostanza nei recipienti di prova (cfr. esempi di schede di raccolta dati nell'allegato 4); vanno riportati nella relazione anche l'efficienza di recupero del metodo e il limite di determinazione;
- qualità dell'acqua nei recipienti di prova (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'allegato 3);
- numero totale di piccoli vivi per ciascun animale riproduttore (cfr. esempio di scheda di raccolta dati nell'allegato 3);
- numero di decessi fra gli animali riproduttori e giorno in cui sono avvenuti (cfr. esempio di scheda di raccolta dati nell'allegato 3);
- coefficiente di variazione per la fecondità dei controlli (basato sul numero totale di piccoli vivi per animale riproduttore vivo alla fine del test);
- diagramma del numero totale di piccoli vivi per animale riproduttore vivo (per ogni replica) alla fine del test sulla concentrazione della sostanza in esame;
- concentrazione più bassa alla quale si osservano effetti (LOEC) sulla riproduzione, comprese una descrizione delle procedure statistiche usate e un'indicazione dell'entità dell'effetto che poteva essere rilevato e concentrazione più alta alla quale non si osservano effetti (NOEC) sulla riproduzione; se del caso, va indicata anche la LOEC/NOEC relativa alla mortalità degli animali riproduttori;
- se del caso, CE_x per la riproduzione e intervalli di confidenza, nonché un grafico del modello approssimato usato per il suo calcolo, la pendenza della curva dose-risposta e il suo errore standard;
- altri effetti biologici osservati o misure effettuate: riferire qualsiasi altro effetto biologico osservato o misurato (ad esempio, crescita degli animali riproduttori) comprese le motivazioni adeguate;
- spiegazione di eventuali deviazioni dal metodo di prova.

3.

BIBLIOGRAFIA

- 1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 March 1993.
- 2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No.6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.
- 3) Baird D.J., Barber J., Bradley M.C., Soares A.M.V.M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **21**, 257-265.
- 4) Elendt B.P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, **154**, 25-33.
- 5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.
- 6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **47**, 775-782.
- 7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 pp.

- 8) Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M.C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.
- 9) Parkhurst B.R., Forte J.L. and Wright G.P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, 1-8.
- 10) Cowgill U.M. and Milazzo D.P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2), 185-196.
- 11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.
- 12) Sims I.R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 2053-2058.
- 13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.
- 14) Dunnett C.W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.
- 15) Dunnett C.W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.
- 16) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.
- 17) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, 510-531.
- 18) Draper N.R. and Smith H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.
- 19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.
- 20) Wilson E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.
- 21) Poole R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.
- 22) Meyer J.S., Ingersoll C.G., McDonald L.L. and Boyce M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

ALLEGATO 1

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 *daphnie* nei mezzi M4 (I) e M7. Per contro, con l'acclimatazione graduale, cioè lo spostamento dal mezzo originario a un mezzo Elendt al 30 %, poi al 60 % e infine al 100 % si sono avuti risultati soddisfacenti. Potrebbe essere necessario prevedere periodi di acclimatazione persino di un mese.

PREPARAZIONE

Oligoelementi

Inizialmente si preparano soluzioni madri 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:

Soluzioni madre I (sostanza singola)	Quantità aggiunta all'acqua mg/l	Concentrazion e (in relazione al mezzo M4) volte	Per preparare la soluzione madre combinata II aggiungere la seguente quantità di soluzione madre I ad acqua ml/l	
			M	4M 7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000	1,0	0,25
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
SrCl ₂ * 6 H ₂ O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	1 260	20 000	1,0	0,25
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	335	20 000	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000	1,0	1,0
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000	1,0	1,0
Na ₂ EDTA * 2 H ₂ O	5 000	2 000	–	–
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	1 991	2 000	–	–
Sia la soluzione Na ₂ EDTA che la FeSO ₄ vengono preparate singolarmente, versate insieme e inserite immediatamente nell'autoclave. Con ciò si ottiene:				
21 soluzione Fe-EDTA		1 000 volte	20,0	5,0

Mezzi M4 e M7

I mezzi M4 e M7 si preparano usando la soluzione madre II, i macronutrienti e le vitamine, nel modo seguente:

	Quantità aggiunta ad acqua mg/l	Concentrazion e (rispetto al mezzo M4) Volte	Quantità di soluzione madre aggiunta per preparare il mezzo ml/l	
			M 4	M 7
Soluzione madre II oligoelementi combinati		20	50	50
Soluzioni madri con macrocostituenti (singola sostanza)				
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	293 800	1 000	1,0	1,0
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000	1,0	1,0
Na ₂ SiO ₃ * 9 H ₂ O	50 000	5 000	0,2	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000	0,1	0,1
Soluzione madre combinata di vitam.	-	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:				
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 ai mezzi 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 Elenndt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasta*, 154, 25-33.

ALLEGATO 2

ANALISI DEL CARBONIO ORGANICO TOTALE (TOC) E PRODUZIONE DI UN NOMOGRAMMA PER IL CONTENUTO DI TOC DELL'ALIMENTO ALGALE

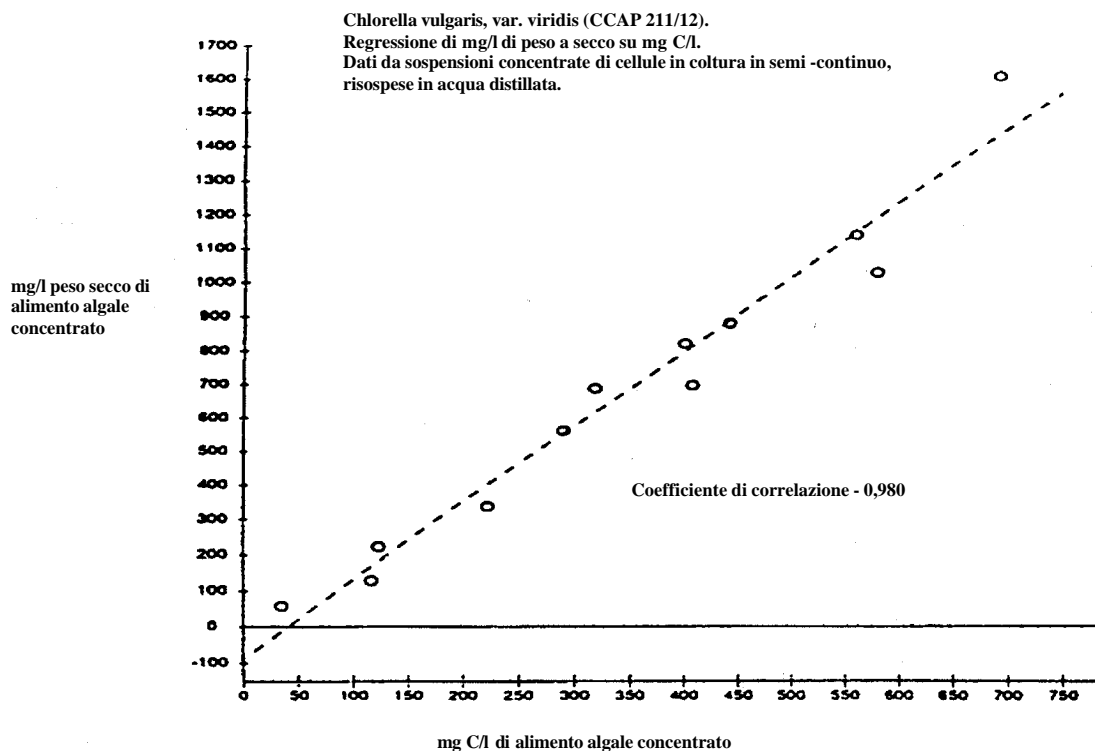
È riconosciuto che il contenuto di carbonio dell'alimento algale non viene di norma misurato direttamente, bensì mediante correlazioni (cioè nomogrammi) con misure sostitutive quali il numero di cellule algali o l'assorbanza della luce.

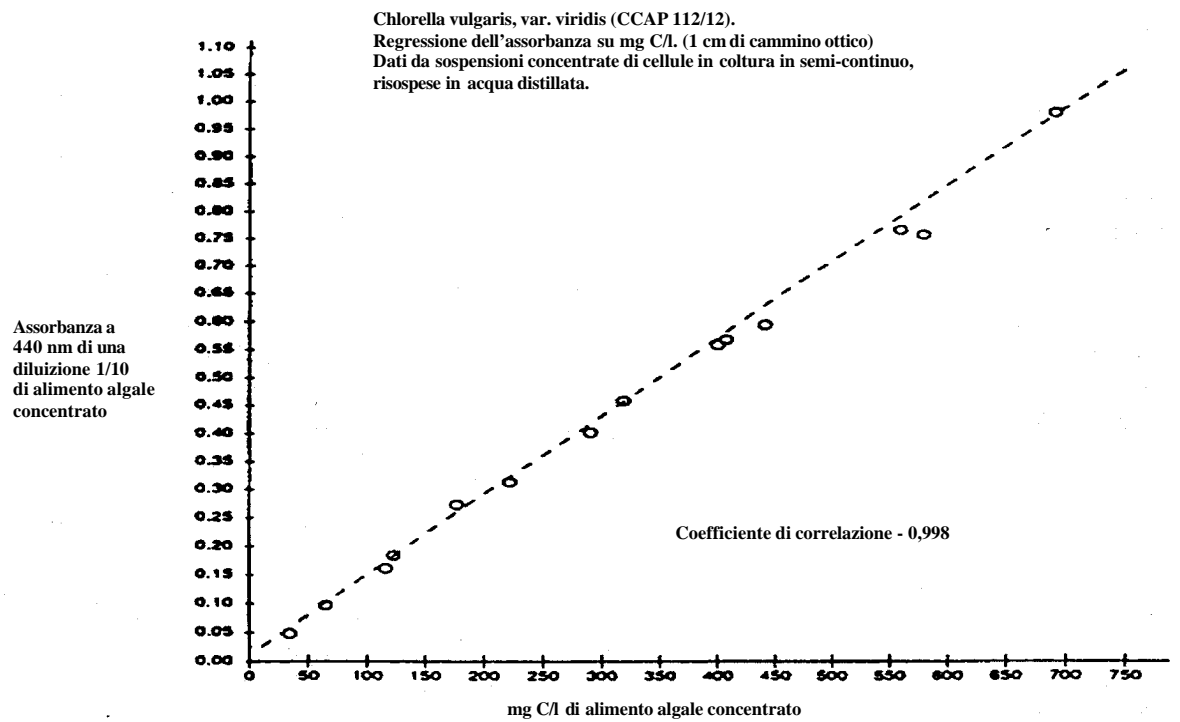
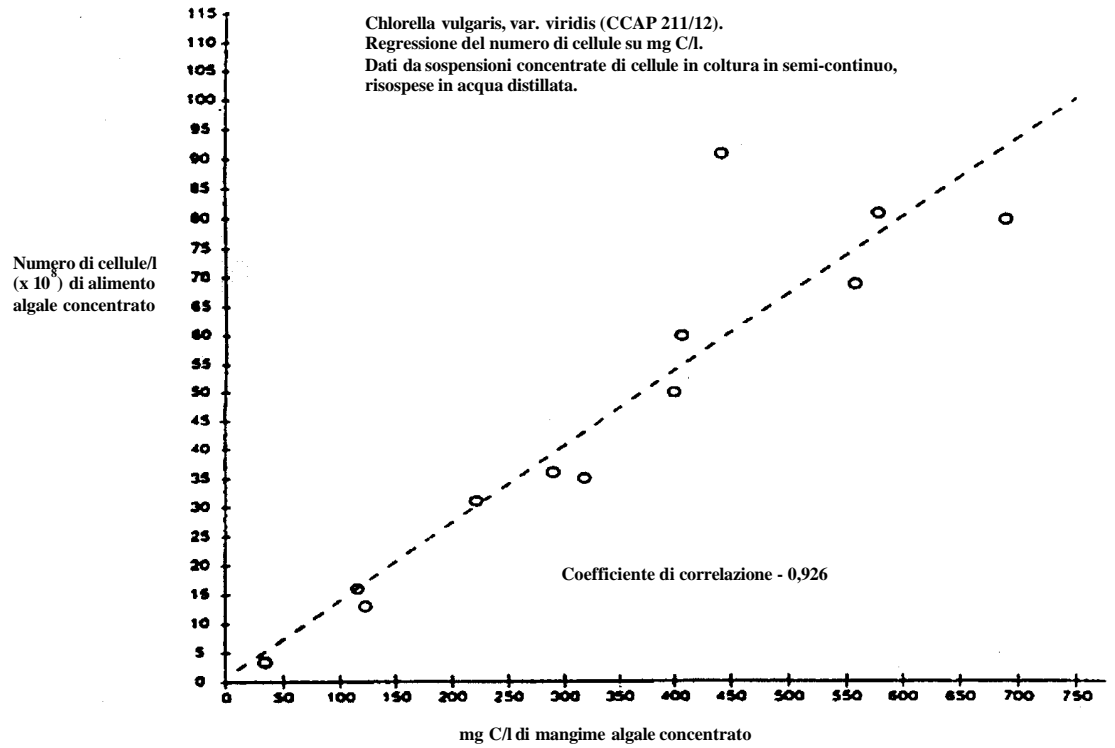
Il TOC dovrebbe essere misurato per ossidazione ad alta temperatura piuttosto che mediante UV o metodi con persolfati. (Vedi: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

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.

Il nomogramma deve essere lineare 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.





ALLEGATO 3

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 DEGLI ADULTI

Esperimento n.: Inizio racc. dati: Clone : Mezzo: Tipo di cibo: Sostanza di prova: Concentraz. nominale:

Giorno	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			
Rinnov.mezzo (spuntare)																									
PH *																									nuovo
																									vecchio
O ₂ mg/l *																									nuovo
																									vecchio
Temp (°C) *																									nuovo
																									vecchio
Sommin. cibo (spuntare)																									
N. di piccoli vivi †																									Totale
Recipiente 1																									
2																									
3																									
4																									
5																									
6																									
7																									
8																									
9																									
10																									
																									Totale
Mortalità cumulativa adulti ‡																									

*Indicare quale recipiente è stato usato per l'esperimento

‡Registrare la mortalità di qualsiasi animale adulto inserendo la lettera 'M' nella casella corrispondente

†Registrare le schiuse abortite inserendo la sigla 'AB' nella casella corrispondente

ALLEGATO 5

CALCOLO DI UNA MEDIA PONDERATA NEL TEMPO

Media ponderata nel tempo

Dato che la concentrazione della sostanza di prova 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 daphnie 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 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.

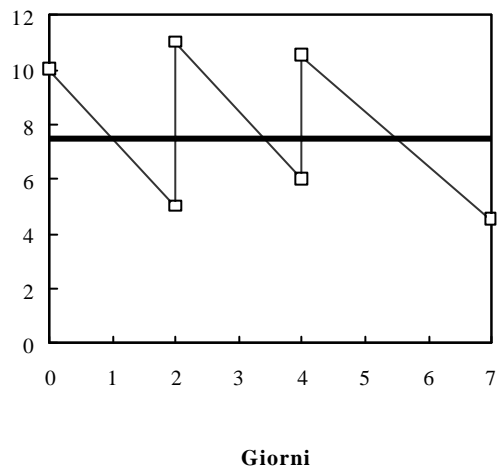


Figura 1: Esempio di media ponderata nel tempo

La Figura 1 mostra un esempio di test (semplificato) della durata di 7 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 di concentrazione segua un processo di decadimento esponenziale.
- I 6 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 della 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	
Giorni totali :					7	Area totale	50,091
						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 rinnov

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:

$$Area = \frac{Conc0 - Conc1}{Ln(Conc0) - Ln(Conc1)} \times Giorni$$

La media ponderata nel tempo (media ponderata/t) è l'*Area totale* divisa per i *Giorni totali*.

Ovviamente per il test di riproduzione con *Daphnia* la tabella andrebbe prolungata 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*. È tuttavia plausibile che il processo di decadimento sia esponenziale e questa è probabilmente la curva migliore da usare in assenza di altre informazioni.

È però necessario 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 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.