

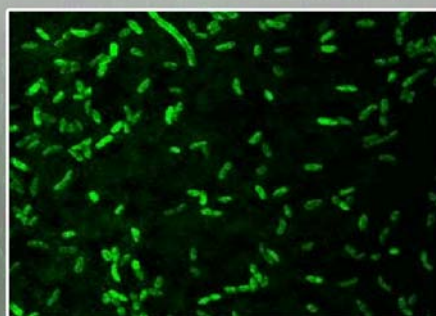


**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

# Batterie di test per la caratterizzazione ecotossicologica dei rifiuti: Stato dell'arte

---



RAPPORTI



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

# **Batterie di test per la caratterizzazione ecotossicologica dei rifiuti: Stato dell'arte**

---

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), le Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA), le Agenzie Provinciali per la Protezione dell'Ambiente (APPA) e le persone che agiscono per loro conto sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo rapporto.

**ISPRA** – Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale  
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma  
[www.isprambiente.it](http://www.isprambiente.it)

ISPRA, Rapporti 156/2012  
ISBN 978-88-4480533-3

Riproduzione autorizzata citando la fonte

**Elaborazione grafica**  
ISPRA

*Grafica di copertina: Franco Iozzoli*

*Foto di copertina:* <http://pcwww.liv.ac.uk/~stewp123/Research.htm>;

<http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/imageListQueryAction.do?photoType=1&className=All>;

[http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Vibrio\\_fischeri](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Vibrio_fischeri)

**Coordinamento editoriale:** Daria Mazzella  
**ISPRA** – Settore Editoria

## **Autori**

**Daniela Conti, Andrea Paina, Stefania Balzamo, Maria Belli** (ISPRA - Servizio AMB LAB)

---

## INDICE

1. INTRODUZIONE.....	Pag	4
1.1 I rifiuti.....	Pag	5
1.1.1 La situazione italiana.....	Pag	7
1.2 Il processo di lisciviazione.....	Pag	10
1.3 I saggi ecotossicologici: test battery approach.....	Pag	11
2. PROGETTO INTERNAZIONALE D'INTERCONFRONTO DEI RIFIUTI.....	Pag	21
2.1 Risultati delle batterie di saggi ecotossicologici.....	Pag	24
2.1.1 Tossici di riferimento.....	Pag	24
2.1.2 Rifiuti.....	Pag	25
2.1.3 Toxkit Microbiotest.....	Pag	27
2.1.4 Saggi addizionali.....	Pag	27
2.2 Caratterizzazione di base: correlazione tra i saggi ecotossicologici e la modellizzazione della speciazione chimica nel lisciviato di rifiuti.....	Pag	29
3. BATTERIE DI TEST PER LA CARATTERIZZAZIONE ECOTOSSICOLOGICA DEI RIFIUTI.....	Pag	31
4. CONCLUSIONI.....	Pag	61
5. BIBLIOGRAFIA.....	Pag	72
6. NORME E METODI.....	Pag	79
7. ALLEGATI.....	Pag	83

---

## 1. INTRODUZIONE

La direttiva 2008/98/CE (e il suo recepimento in ambito nazionale con il DLgs 205/2010) stabilisce il quadro normativo per la gestione dei rifiuti nell'ambito della Comunità Europea, che insieme alle direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE<sup>1</sup> relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze e dei preparati pericolosi, definiscono le caratteristiche di pericolo dei rifiuti, ivi compresa la caratteristica H14, "ecotossico", ovvero, di "rifiuti che presentano o possono presentare rischi immediati o differiti per uno o più comparti ambientali" (Allegato III alla direttiva 2008/98/CE).

La maggior parte degli Stati membri, in attesa della definizione a livello comunitario di un approccio metodologico armonizzato, per effettuare la caratterizzazione ecotossicologica dei rifiuti segue modalità differenti: in alcuni casi vengono applicati i criteri e i metodi della legislazione comunitaria in materia di classificazione ed etichettatura delle sostanze e preparati pericolosi, mentre in altri vengono individuati specifici test ecotossicologici e definiti valori limite *ad hoc*. Per contribuire allo sforzo Europeo di identificazione di una metodologia armonizzata per la definizione della caratteristica di pericolo "ecotossico" per i rifiuti, è di grande importanza affrontare questa problematica anche a livello nazionale.

Il sistema ISPRA/ARPA/APPA tramite il Consiglio Federale ha avviato un programma di lavoro mirato all'armonizzazione dei metodi di campionamento, analisi e misura per le attività di monitoraggio e controllo ambientale. In tale ambito sono stati istituiti due gruppi di lavoro (GdL):

- 1) GdL "Classificazione dei rifiuti" per l'individuazione di criteri omogenei e condivisi per la classificazione dei rifiuti;
- 2) GdL "Definizione di procedure analitiche ed ecotossicologiche ai fini della valutazione della caratteristica di pericolo H14 come recepita nel D.Lgs 205/2010", per lo sviluppo di metodologie di campionamento dei rifiuti e per l'individuazione e applicazione di una batteria di saggi ecotossicologici mediante circuito di interconfronto.

L'ecotossicità di un rifiuto è stata valutata sia mediante la caratterizzazione chimica (*chemical-specific approach*), sia utilizzando saggi biologici di tossicità (*toxicity-based approach*). Nel primo caso, la stima viene effettuata, comparando i risultati delle analisi chimiche con criteri di qualità o valori soglia prestabiliti. Nel secondo caso, invece, l'ecotossicità è misurata direttamente con organismi modello, attraverso la determinazione quantitativa di effetti tossici di diversa natura. I due approcci, chimico e biologico, sono complementari tra loro. Tuttavia, nel caso di miscele o matrici complesse a composizione sconosciuta - caratteristica, questa, comune a molti rifiuti - la determinazione chimica degli inquinanti non consente di stimarne correttamente la potenziale ecotossicità, né di esprimere valutazioni relative al pericolo per gli organismi viventi. Per matrici di siffatta natura, l'utilizzo dei saggi biologici è, pertanto, ritenuto fondamentale. I biosaggi infatti, oltre a fornire indicazioni circa la biodisponibilità delle sostanze inquinanti, integrano gli effetti di tutti i contaminanti presenti (compresi quelli non determinabili mediante le analisi chimiche), rilevando, inoltre, eventuali fenomeni di sinergia e/o antagonismo (Pandard et al., 2006). I saggi ecotossicologici possono essere applicati ai rifiuti per identificare le proprietà intrinseche di potenziale pericolosità rispetto all'ambiente o per valutare il rischio relativo a scenari espositivi sito-specifici.

Sebbene la maggior parte dei saggi ecotossicologici esistenti, armonizzati a livello internazionale, siano stati sviluppati per valutare l'ecotossicità di sostanze chimiche in acque e suoli, o di matrici come acque di scarico ed eluati, tuttavia, possono essere utilizzati, con alcune modifiche, anche per i rifiuti. In particolare, già da alcuni anni, la caratterizzazione ecotossicologica dei rifiuti viene studiata mediante l'applicazione di batterie di saggi, già impiegate con suoli e/o sedimenti, che includono organismi appartenenti a livelli trofici differenti sia del comparto terrestre che di quello acquatico.

Questo rapporto intende presentare lo stato dell'arte in merito alle batterie di saggi ecotossicologici finora utilizzate per valutare l'ecotossicità dei rifiuti.

---

<sup>1</sup> Le direttive citate sono state abrogate dal nuovo regolamento CLP sulla classificazione, etichettatura ed imballaggio delle sostanze e miscele pericolose (Regolamento 1272/2008 del 16 dicembre 2008) a decorrere dal 1 giugno 2015. In particolare le sostanze sono classificate, etichettate ed imballate ai sensi del Regolamento 1272/200/CE a decorrere dal 1° dicembre 2010, mentre le miscele sono classificate, etichettate ed imballate ai sensi del Regolamento 1272/200/CE a decorrere dal 1° giugno 2015.

---

## 1.1 I rifiuti

Con l'emanazione del DLgs 205/2010, entrato in vigore il 25 dicembre 2010, l'Italia ha recepito le prescrizioni previste dalla Direttiva 2008/98/CE sui rifiuti che ha apportato alcune significative modifiche al complesso quadro normativo relativo alla gestione dei rifiuti, già delineato dalla parte IV DLgs 152/2006. All'art. 183 il decreto definisce il rifiuto come “[...] qualsiasi sostanza od oggetto di cui il detentore si disfi o abbia l'intenzione o abbia l'obbligo di disfarsi”.

I rifiuti sono stati classificati in un elenco armonizzato a livello Europeo (Decisione 2000/532/CE) riportato nell'Allegato D alla parte IV del DLgs 152/2006, dove sono identificati da un codice a sei cifre: le prime due cifre identificano l'origine del rifiuto (settore produttivo di origine), le seconde due cifre identificano il processo produttivo che lo ha generato e le ultime due cifre identificano la tipologia del rifiuto. L'Elenco Europeo dei Rifiuti (EER) include i rifiuti pericolosi, tenendo conto della loro origine e della loro composizione, nonché i valori limite di concentrazione delle sostanze pericolose stesse. Tale elenco “è vincolante per quanto concerne la determinazione dei rifiuti da considerare pericolosi”. Tuttavia, “Se un rifiuto è identificato come pericoloso mediante riferimento specifico o generico a sostanze pericolose e come non pericoloso in quanto “diverso” da quello pericoloso (*“voce a specchio”*), esso è classificato come pericoloso solo se le sostanze raggiungono determinate concentrazioni.....tali da conferire al rifiuto in questione una o più caratteristiche di pericolo” (da H1 a H15).

La definizione di rifiuto pericoloso, nella normativa italiana, è riportata sempre all'art. 183 sopra citato, come: “[...] rifiuto che presenta una o più caratteristiche di pericolo”. Tali caratteristiche di pericolosità, definite nell'Allegato I alla parte IV del DLgs 152/2006, sono riportate in tabella 1.

Con la Direttiva 2008/98/CE viene stabilita in modo concreto l'applicazione della valutazione della caratteristica di pericolo H14 (“*Ecotossico*”: rifiuti che presentano o possono presentare rischi immediati o differiti per uno o più comparti ambientali) che era già di fatto contemplata nella Decisione 2000/532/CE anche se non ancora supportata da adeguate norme tecniche di riferimento. In tale sede, infatti, non venivano individuati i criteri per la definizione di pericolo H14, ma veniva lasciato agli Stati Membri l'onere dello studio e dell'applicazione di metodi adeguati. Infatti, nella maggior parte degli Stati membri, anche se con modalità molto diverse tra loro, sono stati individuati criteri specifici per l'attribuzione della caratteristica di pericolo “ecotossico” ai rifiuti.

**Tabella 1 – Caratteristiche di pericolo per i rifiuti**

---

<b>H1 «Esplosivo»:</b> sostanze e preparati che possono esplodere per effetto della fiamma o che sono sensibili agli urti e agli attriti più del dinitrobenzene;
<b>H2 «Comburente»:</b> sostanze e preparati che, a contatto con altre sostanze, soprattutto se infiammabili, presentano una forte reazione esotermica;
<b>H3-A «Facilmente infiammabile»:</b> sostanze e preparati: <ul style="list-style-type: none"><li>- liquidi il cui punto di infiammabilità è inferiore a 21 °C (compresi i liquidi estremamente infiammabili), o</li><li>- che a contatto con l'aria, a temperatura ambiente e senza apporto di energia, possono riscaldarsi e infiammarsi, o</li><li>- solidi che possono facilmente infiammarsi per la rapida azione di una sorgente di accensione e che continuano a bruciare o a consumarsi anche dopo l'allontanamento della sorgente di accensione, o</li><li>- gassosi che si infiammano a contatto con l'aria a pressione normale, o</li><li>- che, a contatto con l'acqua o l'aria umida, sprigionano gas facilmente infiammabili in quantità pericolose;</li></ul>
<b>H3-B «Infiammabile»:</b> sostanze e preparati liquidi il cui punto di infiammabilità è pari o superiore a 21 °C e inferiore o pari a 55 °C;
<b>H4 «Irritante»:</b> sostanze e preparati non corrosivi il cui contatto immediato, prolungato o ripetuto con la pelle o le mucose può provocare una reazione infiammatoria;
<b>H5 «Nocivo»:</b> sostanze e preparati che, per inalazione, ingestione o penetrazione cutanea, possono comportare rischi per la salute di gravità limitata;
<b>H6 «Tossico»:</b> sostanze e preparati (comprese le sostanze e i preparati molto tossici) che, per inalazione, ingestione o penetrazione cutanea, possono comportare rischi per la salute gravi, acuti o cronici e anche la morte;
<b>H7 «Cancerogeno»:</b> sostanze e preparati che, per inalazione, ingestione o penetrazione cutanea, possono produrre il cancro o aumentarne l'incidenza;
<b>H8 «Corrosivo»:</b> sostanze e preparati che, a contatto con tessuti vivi, possono esercitare su di essi un'azione distruttiva;
<b>H9 «Infettivo»:</b> sostanze contenenti microrganismi vitali o loro tossine, conosciute o ritenute per buoni motivi come cause di malattie nell'uomo o in altri organismi viventi;
<b>H10 «Tossico per la riproduzione»:</b> sostanze e preparati che, per inalazione, ingestione o penetrazione cutanea, possono produrre malformazioni congenite non ereditarie o aumentarne la frequenza;
<b>H11 «Mutageno»:</b> sostanze e preparati che, per inalazione, ingestione o penetrazione cutanea, possono produrre difetti genetici ereditari o aumentarne l'incidenza;
<b>H12</b> Rifiuti che, a contatto con l'acqua, l'aria o un acido, sprigionano un gas tossico o molto tossico;
<b>H13 «Sensibilizzanti» (*):</b> sostanze o preparati che per inalazione o penetrazione cutanea, possono dar luogo a una reazione di ipersensibilizzazione per cui una successiva esposizione alla sostanza o al preparato produce effetti nefasti caratteristici;
<b>H14 «Ecotossico»:</b> rifiuti che presentano o possono presentare rischi immediati o differiti per uno o più comparti ambientali.
<b>H15</b> Rifiuti suscettibili, dopo l'eliminazione, di dare origine in qualche modo ad un'altra sostanza, ad esempio a un prodotto di lisciviazione avente una delle caratteristiche sopra elencate.

---

---

La necessità di definire un criterio univoco e condiviso a livello europeo per la classificazione e caratterizzazione dei rifiuti, soprattutto per quanto concerne le proprietà ecotossicologiche, ha portato l'Ente Europeo di normalizzazione (Comité Européen de Normalisation, CEN), ad ampliare le attività della Commissione Tecnica (Technical Committee, TC) 292 "*Characterization of waste*", istituita nel 1991 per l'attuazione della Direttiva sulle discariche (1999/31/CE). Il CEN/TC 292 è attualmente composto da 8 gruppi di lavoro (Working Group, WG) che sono:

WG 1 *Sampling techniques for waste*

WG 2 *Leaching test procedures*

WG 3 *Parameters related to species soluble in mineral acid or water - Analysis and digestion methods*

WG 4 *Terminology*

WG 5 *Analysis of waste. Selected groups parameters*

WG 6 *Basic characterization tests for leaching behaviour*

WG 7 *Characterization of waste - Ecotoxicological properties*

WG 8 *Wastes from the extractive industry.*

Per quanto riguarda più specificatamente gli aspetti ecotossicologici, il WG 7 è stato istituito nel 1999, con lo scopo di studiare l'applicazione di metodi ecotossicologici esistenti e già utilizzati per altre matrici, alla determinazione delle proprietà ecotossiche dei rifiuti (solidi ed estratti acquosi). Il lavoro svolto dal WG7 ha portato alla pubblicazione, nel settembre 2005, della norma EN 14735 - *Characterization of waste – Preparation of waste samples for ecotoxicity tests* - in cui vengono definiti i seguenti aspetti metodologici:

- 1) condizioni di trasporto e conservazione dei campioni di rifiuto;
- 2) preparazione dei campioni di prova;
- 3) preparazione del lisciviato di un rifiuto;
- 4) lista descrittiva dei saggi ecotossicologici applicabili ai rifiuti.

In occasione del Workshop Internazionale (ISPRA, Italia, settembre 2005) organizzato da UBA (Umwelt Bundes Amt, Agenzia Federale Tedesca per l'Ambiente) e dal JRC (Joint Research Centre) venne espressa la necessità di identificare un gruppo di saggi armonizzati (con organismi appartenenti ad ecosistemi e livelli trofici differenti) per la caratterizzazione ecotossicologica dei rifiuti, attraverso il WG7 della CEN/TC292. Venne quindi stabilito che per convalidare la batteria di saggi fosse effettuato un circuito di interconfronto (*ring test*) a livello Europeo. La convalida dei metodi è, infatti, parte essenziale del processo di armonizzazione di un saggio ecotossicologico e ha lo scopo di produrre informazioni circa l'attuabilità (*practicability*) dei saggi e la riproducibilità dei risultati.

Il progetto Internazionale "*Valutazione di una batteria di saggi ecotossicologici per la caratterizzazione di rifiuti o eluati di rifiuti mediante circuito di interconfronto*", organizzato dall'Agenzia Ambientale Federale tedesca (UBA), l'Institut National de l'Environnement industriel et des risques (INERIS), l'Istituto per l'Ambiente e la Sostenibilità dell'EU-JRC (Joint Research Centre), il Federal Institute for Materials Research and Testing tedesco (BAM), l'ECT (Oekotoxikologie GmbH) e il Center for Environmental Technology (CET) dell'Università di Scienze Applicate di Giessen-Friedberg, è stato avviato nel maggio 2006 e si è concluso nel mese di aprile del 2007 con l'invio dei risultati. Ad esso hanno partecipato 67 laboratori europei che hanno eseguito su 3 rifiuti, prodotti e caratterizzati per i componenti maggiori dal BAM (German Federal Institute for Materials Research and Testing), i saggi con organismi acquatici e/o terrestri. I laboratori rappresentavano 15 nazioni differenti; Germania (23), Italia (5), Belgio (5), Francia (4), Repubblica Ceca (4), Portogallo (4), Spagna (4), Svezia (3), Austria (2), Irlanda (1), Olanda (1), Norvegia (1), Repubblica Slovacca (1), Regno Unito (1) e Stati Uniti (1). Una descrizione dettagliata del circuito e dei risultati complessivi dell'interconfronto è riportata nel capitolo 2 del presente rapporto. E' possibile consultare i risultati del *ring test* sul portale web H14-Navigator (<http://ecotoxwasteringtest.uba.de/h14/index.jsp>).

Il CEN/TC WG7, a valle dell'Interconfronto Internazionale e sulla base dei risultati ottenuti, ha dato inizio al processo di convalida della norma EN 14735 attraverso la definizione progressiva dei seguenti aspetti:

1. Incertezza dei risultati: riproducibilità/ripetibilità in accordo alla norma ISO 5725 (dopo la rimozione degli outlier, cioè i laboratori che non hanno seguito il protocollo EN ISO 14735)
2. Revisione di alcuni aspetti della procedura di lisciviazione (quantità del rifiuto/volume del lisciviato, tipologia di filtri utilizzata e loro porosità);
3. Studi di ripetibilità (con il contributo dei laboratori francesi)
4. Miglioramento della lista dei saggi ecotossicologici dell'allegato B (rimozione/aggiunta di saggi (ad es. il saggio con *Arthrobacter globiformis*) e revisione delle limitazioni dei saggi.



Ad oggi, il lavoro svolto ha condotto alla pubblicazione del Rapporto Tecnico *CEN/TR 16110 - Characterization of waste — Guidance on the use of ecotoxicity tests applied to waste*) nel settembre 2010. Queste linee guida costituiscono, al momento, il riferimento principale per l'applicazione dei saggi ecotossicologici finalizzati alla determinazione delle caratteristiche di pericolosità per l'ambiente (ecotossicità) e alla valutazione dei rischi ambientali derivanti da alcune modalità di gestione dei rifiuti. In particolare, le indicazioni contenute riguardano:

- a) la caratterizzazione di base (procedure di lisciviazione, test di conformità, verifiche in campo, test di cessione ed indicazioni generali sull'applicazione di test ecotossicologici e sull'individuazione di batterie minime di test, limiti all'applicazione di test ecotossicologici);
- b) la valutazione del rischio in specifici contesti ambientali (es. trasferimento di inquinanti lungo le catene trofiche);
- c) la gestione di discariche (monitoraggio dei percolati; verifiche di ecotossicità in caso di smaltimento in discariche non controllate);
- d) il riutilizzo dei rifiuti (fanghi in agricoltura; aggregati riciclati per la costruzione dei sottofondi stradali).

### 1.1.1 La situazione italiana

L'Italia ha recepito le indicazioni della Decisione 2000/532/CE in modo differente dagli altri Paesi, tanto che all'allegato D del DLgs 152/2006, vigente anteriormente alle modifiche apportate dal recepimento della Dir. 2008/98/CE, riprende, per le caratteristiche di pericolosità da H3 a H8, H10 e H11, quanto stabilito dalle norme comunitarie, mentre per le caratteristiche H1, H2, H9, H12, H13 e H14 si dice che *“non devono essere prese in considerazione, in quanto mancano i criteri di riferimento sia a livello comunitario che a livello nazionale, e si ritiene che la classificazione di pericolosità possa comunque essere correttamente effettuata applicando [..] i medesimi criteri stabiliti per le altre caratteristiche di pericolo.*

Per ovviare a questa che ormai costituisce un'evidente lacuna rispetto agli altri Paesi della Comunità Europea, il GdL ISPRA “Classificazione dei rifiuti” in collaborazione con L'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ha predisposto il documento: *Parere ISPRA-ISS sulla classificazione dei rifiuti ai fini dell'attribuzione della caratteristica H14 “Ecotossico”* che è stato inviato al Ministero dell'Ambiente il 29 settembre 2011.

Nel Parere sono riportate le modalità di classificazione per la caratteristica di pericolo ecotossico dei rifiuti identificati da “voci specchio”, sia di composizione nota che di composizione non nota.

Quando sia nota la composizione del rifiuto, esso è classificato pericoloso per la caratteristica di pericolo ecotossico, se contiene una o più sostanze, composti o preparati, contraddistinti da frasi di rischio R50, R50-53, R51-53, R52, R52-53, R53 o R59 (tabella 2), in concentrazione pari o superiore:

- 1) al limite specifico di concentrazione inferiore fissato dall'Allegato I alla Direttiva 67/548/CE, oppure
- 2) al limite generico di concentrazione riportato nella tabella 3, qualora le sostanze, composti o preparati figurino nell'Allegato I alla Direttiva 67/548/CE senza limite specifico di concentrazione.

**Tabella 2 - Frasi di rischio e descrizioni di pericolo da prendere in considerazione ai fini della verifica della pericolosità di un rifiuto in relazione alla caratteristica di pericolo H14.**

Frasi di rischio	Descrizione del pericolo
R50	Altamente tossico per gli organismi acquatici
R50-53	Altamente tossico per gli organismi acquatici e può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico
R51-53	Tossico per gli organismi acquatici e può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico
R52	Nocivo per gli organismi acquatici
R53	Può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico
R52-53	Nocivo per gli organismi acquatici e può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico
R59	Pericoloso per lo strato di ozono

Qualora il rifiuto contenga più sostanze, composti o preparati contraddistinti dalle frasi di rischio di cui alla tabella 2 e ciascuno di essi sia presente in concentrazione inferiore al proprio limite specifico o generico di concentrazione, è possibile procedere a verificare l'eventuale sussistenza della caratteristica di pericolo ecotossico per effetto della presenza di più sostanze, composti o preparati classificati come pericolosi per

l'ambiente, secondo il metodo delle sommatorie, ovvero, verificando se le diverse sostanze presenti nel rifiuto, pur non essendo presenti singolarmente a concentrazioni superiori ai limiti, lo sono per effetto della loro somma.

**Tabella 3 - Limiti generici di concentrazione delle singole sostanze con proprietà ecotossiche ai fini dell'attribuzione della caratteristica di pericolo H14 ai rifiuti.**

Frase di rischio	Descrizione del pericolo	Valore limite (%)
R50-53	Altamente tossico per gli organismi acquatici e può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico	0,25
R51-53	Tossico per gli organismi acquatici e può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico	2,5
R50	Altamente tossico per gli organismi acquatici	
R52	Nocivo per gli organismi acquatici	
R53	Può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico	25
R52-53	Nocivo per gli organismi acquatici e può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico	
R59	Pericoloso per lo strato di ozono	0,1

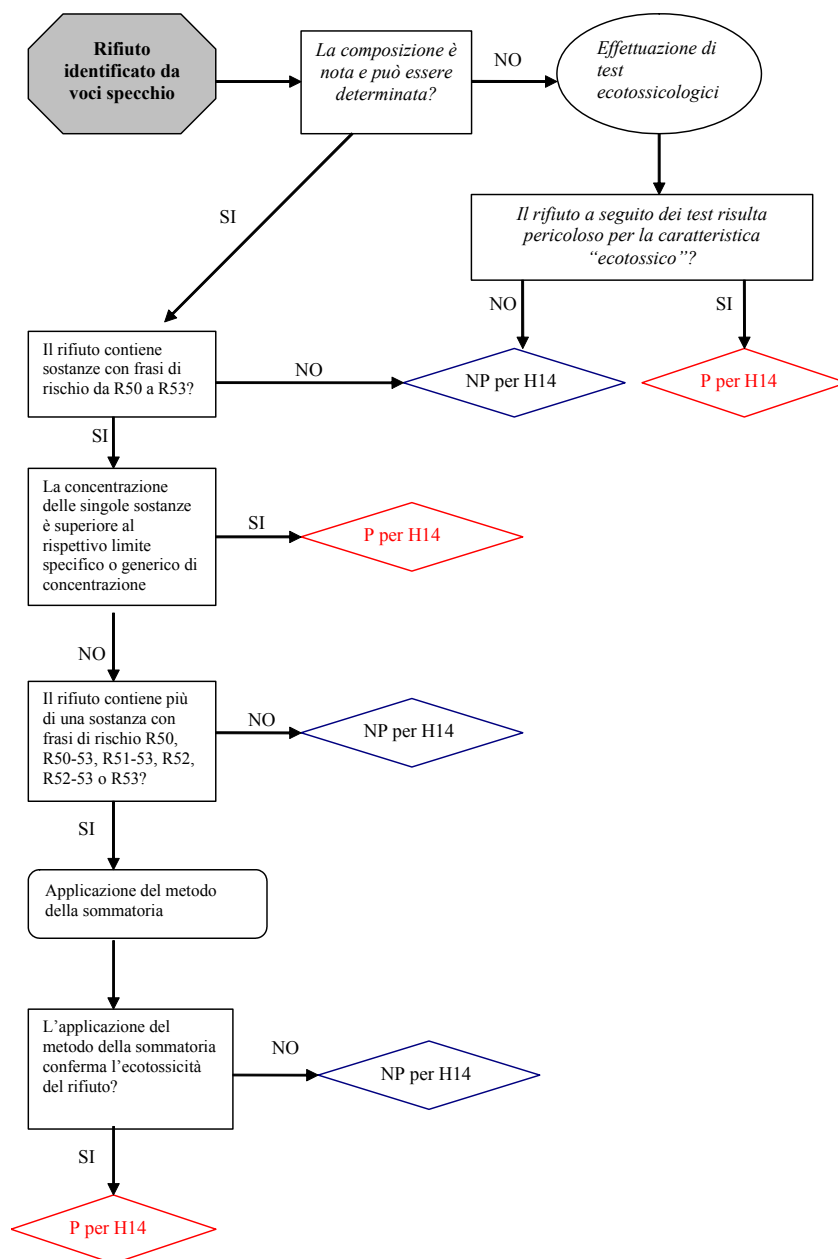
Diversamente, laddove la composizione del rifiuto non sia nota e non possa essere determinata nemmeno sulla base delle informazioni relative al ciclo produttivo ed ai trattamenti che generano il rifiuto, diviene necessario procedere alla conduzione di saggi di ecotossicità. Il Parere ISPRA-ISS propone quindi l'utilizzazione di una batteria di organismi acquatici da applicare al lisciviato di rifiuto e i valori limite di tossicità ai fini della classificazione del rifiuto come ecotossico (tabella 4).

**Tabella 4 - Saggi ecotossicologici da effettuare su lisciviato di rifiuto ai fini della classificazione del rifiuto come pericoloso per la caratteristica H14. Tabella tratta da Parere ISPRA-ISS.**

Saggio	Norma di riferimento	Organismo/Specie	Tipo di tossicità	Risultato	Valori limite
Determinazione dell'effetto inibitorio di campioni acquosi sull'emissione di luce di <i>Vibrio fischeri</i> (prova su batteri luminescenti)	UNI EN ISO 11348	Batteri/ <i>Vibrio fischeri</i>	Acuta (30 min)	EC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub> < 10%
Prova d'inibizione della crescita di alghe d'acqua dolce per mezzo di alghe verdi unicellulari	UNI EN ISO 8692	Alghe/ <i>P.subcapitata</i> ; <i>D. subspicatus</i>	Cronica (72 h)	EC <sub>20</sub> EC <sub>50</sub>	EC <sub>20</sub> < 20%
Determinazione dell'inibizione della mobilità della <i>Daphnia magna</i> . Prova di tossicità acuta.	UNI EN ISO 6341	Crostacei/ <i>D. magna</i>	Acuta (24, 48 h)	EC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub> < 10%

Nella figura 1 è presentato uno schema del processo finalizzato all'attribuzione, ad un rifiuto generico, delle caratteristiche di ecotossicità.

Recentemente, il punto 5 dell'allegato D, parte IV del DLgs 152/2006 è stato modificato dal DL 2/2012 (art. 3, comma 6), stabilendo, nelle more dell'emanazione di uno specifico decreto da parte del MATTM, che la definizione della caratteristica di pericolo H14 deve essere attribuita secondo le modalità dell'accordo Internazionale per il trasporto di merci pericolose ADR (Accord Dangereuse Routiers, Accord European Relatif au Transport International des Marchandises Dangereuse par Route). Questo Accordo prevede, per quanto riguarda i saggi ecotossicologici, l'applicazione dei metodi previsti dal Regolamento 2008/440/CE all'Allegato C: test acuto con pesci (C1), test acuto con *Daphnia* (C2) e test cronico con alghe unicellulari (C3). AL momento quindi, il parere ISPRA-ISS è superato dalla modifica citata. Tuttavia, emergono alcune perplessità relativamente all'applicazione *sic et simpliciter* di questi saggi ai rifiuti. In particolare, vogliamo segnalare quelli che a nostro avviso appaiono gli aspetti più discutibili: a) la non prevista preparazione di una matrice acquosa (lisciviato) da rifiuto cui esporre gli organismi acquatici; b) i valori limite espressi in



**Figura 1** – Schema di flusso per l'attribuzione della caratteristica di pericolo H14. Tratto da Parere ISPRA-ISS

mg/L; c) le difficoltà tecnico-operative di esecuzione di un saggio con pesci. In merito a quest'ultimo punto, abbiamo calcolato che l'esecuzione di un solo test acuto (5 concentrazioni, senza range-finding test) richiederebbe la produzione di 120 L di matrice acquosa di rifiuto. L'impiego di animali vertebrati, inoltre, è consentito a livello nazionale solo nel rispetto del D.Lvo. 116/1992 (recepimento Direttiva 86/609/CEE) e come tale prevede una richiesta di autorizzazione specifica presso il Ministero della Salute. Allo stato attuale, in Italia, solo tre laboratori hanno le necessarie autorizzazioni, attrezzature e competenze per eseguire i saggi di tossicità con pesci.

---

## 1.2 Il processo di lisciviazione

Per determinare l'ecotossicità delle sostanze contenute in un rifiuto è necessario definire inizialmente la loro mobilità nell'ambiente. Questo comportamento ambientale è studiato mediante diversi tipi di procedure descritte in norme tecniche in cui è prevista l'estrazione/lisciviazione mediante solvente, simulando in tal modo il trasferimento, che avviene nell'ambiente, delle sostanze dalla fase solida a quella liquida.

La lisciviazione è definita come la dissoluzione dei costituenti solubili dalla fase solida alla fase liquida (lisciviante). Tuttavia, il fenomeno presenta una maggiore complessità e comporta processi diversi, quali la solubilizzazione, la diffusione e il dilavamento (*wash off*). Per questo motivo sono state sviluppate procedure di lisciviazione a breve o lungo termine, con differenti rapporti liquido/solido, con un lisciviante costituito da acqua distillata o additivata di acidi o basi per la valutazione dell'influenza del pH. Ognuno di questi test di lisciviazione fornisce informazioni diverse. D'altra parte, solo utilizzando condizioni procedurali differenti è possibile studiare il meccanismo che controlla il rilascio degli inquinanti, fondamentale per valutare il comportamento a lungo termine dei rifiuti nell'ambiente.

I documenti Europei sviluppati dal CEN in merito alle diverse procedure di lisciviazione sono: le norme EN 14735 e UNI EN 12457-2 (test di conformità per la lisciviazione dei rifiuti granulari) e i rapporti tecnici TS 14429 (Influenza del pH sulla lisciviazione) e TS 14405 (test di percolazione).

Come stabilito a livello normativo, i rifiuti devono essere sottoposti a tre differenti livelli di caratterizzazione:

- i) caratterizzazione di base per ottenere informazioni sul comportamento a breve e a lungo termine e le proprietà caratteristiche di un rifiuto;
- ii) verifica della conformità, necessaria al controllo per il rispetto dei valori di legge
- iii) caratterizzazione *in situ*, cioè l'insieme delle prove di analisi condotte all'arrivo dei rifiuti presso il sito di trattamento o smaltimento. I semplici test di conformità o le verifiche *in situ* devono essere comunque supportati da una preliminare caratterizzazione di base.

Per questi motivi, la scelta del test di lisciviazione più idoneo dipenderà dallo scopo che ci si prefigge di raggiungere. In particolare, i parametri che devono essere considerati con particolare attenzione sono: a) il rapporto tra liquido e solido da applicare, b) la presenza di particolato in sospensione nel lisciviato e c) la quantità di materia organica presente in soluzione (DOC – carbonio organico disciolto). Questi, infatti, influenzano il trasferimento delle sostanze in soluzione. Anche la speciazione dei composti presenti nel lisciviato è cruciale per il possibile effetto tossico del rifiuto, poiché essa determina la mobilità delle sostanze nell'ambiente e la biodisponibilità per gli organismi.

La procedura indicata dalla norma EN14735, richiesta anche dalla legislazione italiana per lo smaltimento in discarica e il recupero dei rifiuti, prevede l'utilizzo di un debole estraente, come acqua distillata, deionizzata o demineralizzata, in un rapporto solido/liquido pari a 1/10 e una lisciviazione di 24 ore sotto continua agitazione. Nel lisciviato così prodotto vengono determinati alcuni parametri chimico-fisici, in particolare: il pH, che può o meno richiedere modificazioni nell'esecuzione dei test ecotossicologici, la presenza di sali (conducibilità) che possono condizionare l'ecotossicità del lisciviato e la presenza di materia organica disciolta (DOC), che può influenzare la solubilità degli inquinanti organici presenti nel rifiuto stesso.

---

### 1.3 I saggi ecotossicologici: *test battery approach*

I saggi ecotossicologici sono prove sperimentali di tossicità (di durata variabile), eseguite con specie animali o vegetali, applicabili a composti chimici e matrici ambientali (effluenti, suoli, sedimenti, rifiuti) per individuarne le proprietà potenzialmente pericolose (*hazard identification*), per effettuare valutazioni di rischio in relazione alle specifiche situazioni espositive e, quando possibile, per identificare i livelli più bassi di esposizione in cui non viene osservato alcun effetto (No Observed Adverse Effect Concentration, NOAEC). Tali saggi prendono in esame diverse tipologie di effetti dannosi (*endpoint*): letali, come la mortalità e subletali come gli effetti sulla riproduzione, sulla crescita (individuale e di popolazione), le alterazioni di parametri metabolici, fisiologici e comportamentali. A tutt'oggi la mortalità costituisce l'*endpoint* maggiormente indagato.

Sulla base del tempo di esposizione al campione e in funzione della durata del ciclo vitale dell'organismo di prova, i saggi ecotossicologici vengono distinti in: saggi a breve termine o acuti e saggi a lungo termine o cronici. In merito a tale distinzione la letteratura presenta definizioni diverse e a volte contraddittorie. Per gli scopi di questo lavoro si fa riferimento al rapporto ECETOC (1993) riportato da Baudo et al., 2011, secondo cui è possibile distinguere fra:

1. Tossicità acuta – Effetti avversi che si manifestano in un arco temporale breve (non superiore ad un terzo del tempo medio tra nascita e raggiungimento della maturità sessuale e durante il quale l'organismo può essere mantenuto in buone condizioni in assenza di alimentazione) dopo la somministrazione di una singola dose di una sostanza.
2. Tossicità subacuta (subletale) – Effetti avversi che si manifestano dopo l'esposizione ad una sostanza per un periodo  $\leq 10\%$  della vita dell'organismo (e durante il quale gli organismi vengono alimentati).
3. Tossicità cronica – Effetti avversi che si manifestano dopo l'esposizione ad una sostanza per un periodo  $> 50\%$  della vita dell'organismo.

In molti casi la tossicità acuta è stata identificata con la sola tossicità letale e la tossicità cronica con quella subletale, anche se in realtà vi sono saggi di tossicità acuta subletale e di tossicità cronica letale.

L'ecotossicità può essere studiata sia sulla fase solida di una matrice, che su matrici liquide. Queste ultime possono essere costituite da campioni propriamente acquosi (acque di scarico, acque superficiali, acque di falda) che da elutriati e/o lisciviati di matrici solide (sedimenti, suoli, rifiuti). Le prove condotte sull'estratto acquoso consentono di valutare la tossicità dei contaminanti biodisponibili e aiutano a comprendere il rischio ecotossicologico dovuto alla lisciviazione e al trasporto di queste sostanze nella falda acquifera. I risultati ottenuti da saggi sulla fase solida evidenziano la tossicità della matrice *in toto* così come si presenta in condizioni naturali, dove si verificano le interazioni con gli organismi e tra le diverse sostanze.

Gli organismi, vegetali o animali, utilizzati nei saggi ecotossicologici devono essere ben conosciuti dal punto di vista biologico, ecologico e genetico e avere le seguenti caratteristiche:

- a) essere sani;
- b) avere comportamento normale;
- c) essere appropriatamente alimentati;
- d) essere della stessa specie, classe ed età;
- e) presentare bassa o nulla mortalità nei controlli.

I saggi possono essere condotti utilizzando una singola specie o più specie diverse in esperimenti indipendenti. La scelta della (o delle) specie è particolarmente importante e viene effettuata sulla base di differenti criteri, a seconda dello scopo dell'indagine.

In ambito tossicologico ed ecotossicologico, è opinione consolidata che un singolo organismo o modello sperimentale non sia in grado di rappresentare la complessa varietà di risposte agli *stressori*, né di garantire risultati attendibili per tutte le possibili tipologie di matrici (Pandard et al., 2006; Baudo et al., 2011). Poiché la sensibilità delle comunità animali e vegetali agli inquinanti varia, in modo significativo, da una specie all'altra, l'impiego di un solo saggio produce risultati con un elevato livello di incertezza. Pertanto, una caratterizzazione ecotossicologica realistica necessita dell'utilizzo di batterie di saggi che impieghino organismi appartenenti a livelli trofici differenti e comprendano valutazioni sia a breve che a lungo termine (Filipic, 1995; Nielsen and Ranck, 1994; Dell'Orto et al., 1997). Inoltre, la combinazione di *endpoint* differenti incrementa ulteriormente il valore predittivo di questi saggi (Bierkens et al., 1998).

Indipendentemente dalla sua specifica applicazione, una batteria di saggi ecotossicologici deve comprendere almeno tre specie di organismi. Gli stadi vitali delle specie selezionate devono essere ben

---

distinti dal punto di vista filogenetico e appartenere a differenti gruppi tassonomici e a livelli funzionali diversi della catena alimentare: produttori primari vegetali, decompositori/saprofiti, detritivori/filtratori, consumatori propriamente detti. (Baudo et al., 2011).

I criteri di scelta degli organismi di una batteria di saggi ecotossicologici sono in parte sovrapponibili a quelli propri dei saggi monospecifici. Ducrot et al. (2005), a proposito della valutazione tossicologica dei sedimenti, ha definito tali caratteristiche:

- a) facilità di allevamento e manipolazione,
- b) disponibilità di allevamento,
- c) sensibilità (capacità di rilevare la tossicità),
- d) riconoscimento come specie di riferimento in metodi normati e convalidati,
- e) larga distribuzione geografica,
- f) rilevanza ecologica/economica,
- g) vicinanza filogenetica ed ecologica con le specie dominanti dell'ambiente studiato.

Le dimensioni degli organismi e la loro compatibilità con il tipo di esposizione e gli *endpoint* prescelti costituiscono parametri ulteriori da considerare.

Il problema dei criteri d'identificazione delle batterie più appropriate per ogni singola matrice ambientale, costituisce uno degli argomenti scientifici più dibattuti nell'ambito ecotossicologico. Infatti, se da un lato i saggi biologici che compongono una batteria devono poggiare su solide basi scientifiche e devono utilizzare una procedura armonizzata, dall'altro è *indispensabile contenerne il numero e la complessità entro limiti ragionevoli, compatibili con un'applicazione di routine* (Baudo et al., 2011).

Molto interessante e completo appare lo sforzo fatto da Baudo et al., 2011, in seno alle attività della Commissione UNICHIM "Qualità dell'acqua – Gruppo di Lavoro "Metodi Biologici", Sottogruppo "Acque salate/salmastre e sedimenti", di individuare batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque salate e salmastre. Questi autori propongono, infatti, un metodo per l'identificazione di batterie di saggi diversificate in funzione dell'ambiente su cui viene effettuata l'indagine e degli obiettivi dell'analisi ecotossicologica, privilegiando, nella scelta degli organismi, fra tutti, il requisito della fattibilità (facilità di reperimento e allevabilità delle specie, saggi statici e semistatici). Ogni batteria si compone di *saggi prescritti* obbligatori e di *saggi raccomandati* che forniscono informazioni supplementari non ricavabili in altro modo. Il sistema di Baudo et al., 2011 prevede una fase di verifica riguardante in primo luogo la validità delle batterie proposte attraverso l'utilizzo sistematico di protocolli armonizzati da parte di un numero non troppo esiguo di operatori, per un periodo di prova prefissato, e dall'altro, l'introduzione di eventuali innovazioni metodologiche e/o l'esame di nuove proposte di sostituzione di saggi, nonché la revisione della composizione delle diverse batterie. Il metodo di analisi proposto, ancorché da perfezionare sulla base delle esperienze applicative, è valido per qualsiasi batteria di saggi ecotossicologici, già in uso o nuova, e si basa sulla ponderazione di diversi parametri che caratterizzano i saggi biologici e che concorrono alla valutazione della valenza ecologico-scientifica e della praticità-fruibilità della batteria stessa. Si rimanda al capitolo 2 di Baudo et al., 2011 per la descrizione dettagliata dei parametri e dei fattori numerici di ponderazione attribuiti loro.

Il problema che si accompagna e segue all'identificazione di una batteria per la valutazione di una matrice ambientale è costituito dall'interpretazione complessiva dei singoli risultati ottenuti dai diversi saggi ecotossicologici. Infatti, sebbene, le normative ambientali raccomandino sempre più fortemente l'utilizzo di batterie, ad oggi, gli studi riguardanti l'elaborazione di indici sintetici o di scale di tossicità sono ancora piuttosto limitati e molto diversi tra loro.

Alcuni di questi approcci (Costan et al. 1993; Vindimian et al., 1999; Ahlf and Heise., 2005; Environment Canada 1993, Bombardier and Birmingham, 1999) che riguardano in modo particolare i sedimenti sono sinteticamente riassunti nella tabella 5.

Per quanto riguarda i rifiuti, la norma EN 14735:2005 stabilisce, nell'Allegato B, che i saggi ecotossicologici da utilizzare nelle batterie, oltre ad avere un metodo armonizzato almeno a livello nazionale, devono possedere i seguenti criteri:

- rilevanza ecologica
- sensibilità ai composti tossici
- riproducibilità dei risultati
- attuabilità
- affidabilità

- 
- robustezza
  - potere discriminatorio

La sensibilità e il potere discriminatorio complessivo di una batteria di saggi dovrebbe essere tale da renderla idonea al maggior numero di tipologie di rifiuto.

La linea guida CEN/TR 16110:2010, indica due metodi per selezionare i saggi ecotossicologici di una batteria:

- metodo *a priori* che si basa su criteri di scelta quali ad esempio la convalida del metodo, la rilevanza ecologica, ecc., senza considerare la produzione di risultati,
- metodo *a posteriori* che utilizza i risultati ottenuti dall'esecuzione di un elevato numero di saggi con *endpoint* e organismi differenti.

Per quanto riguarda il metodo *a priori*, esiste accordo a livello internazionale circa i criteri, quali robustezza, rilevanza ecologica ecc., elencati nelle pagine precedenti, che devono essere considerati per identificare e selezionare i saggi di una batteria. Tuttavia, è importante stabilire “il peso” di ciascun criterio che dipende dallo scopo della valutazione ecotossicologica, sia questa la determinazione delle proprietà intrinseche del campione, l'identificazione del potenziale rischio ecologico in funzione delle modalità espositive o la valutazione del rischio *in situ*. A tale proposito, si riportano nella tabella 6 i pesi (espressi con un punteggio da 1 a 3) attribuiti a ciascun criterio rilevante per la selezione dei saggi di una batteria per i rifiuti, in funzione dei possibili scenari di esposizione, come indicato dalla Linea guida CEN/TR 16110:2010.

**Tabella 5 - Scale e indici sintetici per la valutazione di batterie applicate a campioni acquosi e sedimenti**

Campo di applicazione	Espressione dei risultati dei saggi	Scale e indici di tossicità	Riferimento bibliografico																								
Caratterizzazione ecotossicologica matrice acquosa, sedimento e biota	EC50 UT <sup>a</sup> = 100/EC50	<p>E' proposto l'utilizzo di una scala di tossicità composta da 5 classi. Viene indicato l'esempio della scala di tossicità utilizzata per Daphnia magna dai laboratori ARPAL:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>1 % campione tal quale</th> <th>EC50</th> <th>UT</th> <th>Giudizio di tossicità</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>&lt;20</td> <td></td> <td>0</td> <td>non tossico</td> </tr> <tr> <td>≥ 20 &lt;50</td> <td></td> <td>&lt; 1</td> <td>poco tossico</td> </tr> <tr> <td>≥ 50</td> <td>100-10</td> <td>1 - 10</td> <td>tossico</td> </tr> <tr> <td>&gt; 50</td> <td>&lt; 10-1</td> <td>11 - 100</td> <td>molto tossico</td> </tr> <tr> <td>&gt; 50</td> <td>&lt; 1</td> <td>&gt; 100</td> <td>estremamente tossico</td> </tr> </tbody> </table>	1 % campione tal quale	EC50	UT	Giudizio di tossicità	<20		0	non tossico	≥ 20 <50		< 1	poco tossico	≥ 50	100-10	1 - 10	tossico	> 50	< 10-1	11 - 100	molto tossico	> 50	< 1	> 100	estremamente tossico	Rapporto RTI CTN_AIM 4./2001
1 % campione tal quale	EC50	UT	Giudizio di tossicità																								
<20		0	non tossico																								
≥ 20 <50		< 1	poco tossico																								
≥ 50	100-10	1 - 10	tossico																								
> 50	< 10-1	11 - 100	molto tossico																								
> 50	< 1	> 100	estremamente tossico																								
Sedimenti di acqua dolce	Percentuale di inibizione rispetto al controllo	<p>Scala di tossicità composta da 5 classi:  <b>Classe 1</b> - nessun saggio presenta una risposta;  <b>Classe 2</b> - almeno 1 saggio presenta una bassa risposta, nessun saggio presenta una risposta moderata o superiore;  <b>Classe 3</b> - almeno 1 saggio presenta una risposta moderata, nessun saggio presenta una risposta più elevata;  <b>Classe 4</b> - 1 saggio presenta una risposta elevata, oppure 3 saggi presentano una risposta almeno moderata;  <b>Classe 5</b> - almeno 2 saggi presentano una risposta elevata, oppure 4 o più saggi presentano almeno una moderata tossicità.                      Le percentuali di inibizione per risposta bassa o nulla, moderata ed elevata sono fissate arbitrariamente.</p>	Ahlf and Heise, 2005																								
Effluenti industriali	LOEC e NOEC per il calcolo della Concentrazione Soglia di Effetto (TEC) <sup>b</sup>	<p>Le TEC dei vari saggi di una batteria sono trasformate in UT = 100/TEC e addizionate per ricavare l'indice PEEP (Potential Ecotoxic Effects Probe) utilizzando questa espressione matematica:</p> $P = \log_{10} \left[ 1 + n \left( \sum_{i=1}^N Ti / N \right) Q \right]$ <p>P: Indice PEEP; n: numero di endpoint nei saggi che mostrano una risposta tossica; N: numero totale di endpoint considerati nella batteria impiegata; Ti: Unità tossiche di un endpoint; Q: portata dello scarico in m<sup>3</sup>/h</p> <p><u>Indice PEEP modificato</u>                      Scompare la trasformazione logaritmica e l'Indice diventa P1:</p> $P1 = \left[ (5 \sum UTa) + (\sum UTc) / (5N_1 + N_2) \right] Q$ <p>UTa e UTc: Unità Tossiche per endpoint acuti e cronici; N1 e N2: numero di endpoint acuti a cronici; Q: portata</p>	Costan et al., 1993 Vindimian et al., 1999																								
Sedimenti	EC50 Unità Tossiche sul peso secco del sedimento (UT <sub>dw</sub> )	<p>Viene elaborato l'indice SED-TOX specifico per tutti i tipi di sedimenti di cui si prendono in considerazione le 4 fasi principali (acqua interstiziale, estratti organici, sedimento umido e sedimento intero) e gli elutriati. La scelta dei saggi di tossicità da comporre in una batteria, tiene conto del livello trofico degli organismi utilizzati (che possono essere batteri, alghe, macrofite, pesci e invertebrati bentonici, epibentonici o pelagici) e della loro sensibilità ai contaminanti, della presenza di diversi endpoint e delle risorse disponibili nei laboratori. Per ciascun test, le risposte di tossicità sono valutate secondo 4 classi di pericolo (non tossico, debolmente tossico, moderatamente tossico, altamente tossico) stabilite sulla base del giudizio esperto e specifiche per ciascun saggio e in funzione di ognuna delle quattro fasi di sedimento analizzate.</p> <p>L'elaborazione dell'Indice SED-Tox viene effettuata in 2 fasi: 1) conversione dei risultati e 2) integrazione dei risultati. In sintesi, nella fase di conversione i risultati di ciascun test sono trasformati in UT sul peso secco del sedimento (TU<sub>dw</sub>) e questo parametro è utilizzato per calcolare il Fattore di Incremento Tossico, TIF (=TU<sub>dw</sub>/DL). Dopo il calcolo dei valori di TIF, le risposte di tossicità sono classificate secondo questa scala : TIF = 0 non tossico; 1 &lt; TIF &lt; 10 debolmente tossico; 11 &lt; TIF &lt; 99 moderatamente tossico; TIF &gt; 100 altamente tossico. Successivamente i valori di TIF di ciascun endpoint sono ponderati in base alla fase, al numero di endpoint al fattore di sensibilità delle fasi (sempre pari a 1, eccetto che per gli estratti in cui è pari a 0,1) e poi divisi per la ridondanza (saggi sulla stessa combinazione di fasi) (= Cumulative Average of phase Toxicity, CAPT):</p>	Bombardier and Bermingham, 1999																								



		$CAPT = \left[ \left( a \sum TIF_{pw} / N_{pw} \right) + \left( b \sum TIF_{wt} / N_{wt} \right) + \left( c \sum TIF_{ws} / N_{ws} \right) + \left( d \sum TIF_{oe} / N_{oe} \right) \right] / r$ <p>Pw: acqua interstiziale; wt: sedimento umido; ws: sedimento intero; oe: estratto organico; r: ridondanza</p> <p>Moltiplicando il CAPT per il numero di fasi che mostrano una risposta tossica si ottiene l'Impronta Tossica (nCAPT). L'Indice SED-TOX viene quindi calcolato aggiungendo 1 (questo assicura che il suo valore sia zero quando la tossicità non è misurabile in nessun test) e trasformato in log<sub>10</sub>:</p> $SED - TOX = \log_{10} [1 + n(CAPT)]$ <p>0 &lt; SED-TOX &lt; 1                      Tossicità marginale  1 &lt; SED-TOX &lt; 2                      Tossicità moderata  SED-TOX &gt; 2                            Tossicità elevata</p> <p>Poiché i valori dell'indice SED-TOX sono logaritmici, un incremento di 1 si traduce in un aumento di 10 volte dell'impronta tossica. Le impronte tossiche possono essere combinate insieme per calcolare il punteggio di SED-TOX per un determinato sito.</p>	
Acqua e sedimenti	% di risposta	<p>Elabora un metodo di classificazione del rischio tossicologico per una batteria di saggi di tossicità applicata a campioni acquosi e sedimenti. Per il calcolo del punteggio da attribuire ad un sito o ad un campione vengono combinati i seguenti parametri:</p> <p>1) severità della risposta: dipende dall'effetto misurato (sono assegnati a 3 endpoint i seguenti fattori di ponderazione: mortalità = 3; fecondità ridotta = 2; crescita ridotta = 1);</p> <p>2) grado della risposta: misura la proporzione di organismi che rispondono ed è in percentuale rispetto al valore medio del controllo (ad es. per la mortalità = 100 x [(mortalità campione - mortalità controllo)/n° iniziale di organismi esposti]);</p> <p>3) variabilità del saggio: esprime la variabilità specifica del saggio per un determinato campione e viene rappresentata dal coefficiente di variazione CV (del grado della risposta) tra le repliche del campione (CV = 100 x (DS/M))</p> <p>4) consistenza tra saggi e numero di endpoint misurati: è un valore elevato se tutti i saggi concordano nel risultato esprimendo quindi un'elevata fiducia di poter identificare una situazione di rischio, diminuisce se i risultati sono contraddittori (C= [(N/2) - X]<sup>3</sup> dove N è il n° totale di endpoint e X è il n° di endpoint statisticamente non significativi p&lt;0,05).</p> <p>Il punteggio del sito = {∑[(severità) (% di risposta) (CV)]} + {(N/2) - X}<sup>3</sup> / √N  Il punteggio tossicità = {∑[(severità) (% di risposta)]} / √N</p> <p>Il confronto tra questi due punteggi permette di interpretare la tossicità in termini di rischio: se il campione presenta un effetto tossico e i diversi endpoint sono tra loro consistenti, il rischio è maggiore rispetto al caso con uguale punteggio, ma con endpoint tra loro discordanti..</p> <p>Il punteggio calcolato permette un confronto tra campioni diversi sottoposti alla stessa batteria o dello stesso sito nel tempo, ma non consente di confrontare campioni saggiati con batterie differenti.</p>	Hartwell, 1997
Sedimenti di acque salate e salmastre	% di risposta	<p>L'indice deriva da quello di Hartwell 1997 e viene rielaborato intervenendo sui seguenti aspetti:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- la valutazione dell'effetto di biostimolazione (che ad es. nel caso del saggio algale indica eutrofizzazione) e di ormesi;</li> <li>- il calcolo dell'indice (punteggio del campione) separato per ciascun campione che consente di realizzare mappe di tossicità per un dato sito, invece di esprimere la tossicità complessiva di un sito;</li> <li>- al posto del CV per la variabilità, la correzione della percentuale di risposta è basata sul confronto statistico campione-controllo, mediante un t test per varianze diseguali o la differenza minima significativa MSD<sup>d</sup>, espressi come coefficiente correttivo statistico, ccs;</li> <li>- il numero di endpoint presi in considerazione è maggiore e sono assegnati i seguenti fattori di ponderazione: comportamento = 1; mutagenicità e genotossicità = 2; sviluppo (schiusa uova, fecondazione, metamorfosi, fissazione larve) = 3; crescita (taglia, peso, divisione cellulare) = 4; bioluminescenza = 4.5; mortalità/immobilizzazione = 5.</li> <li>- viene introdotto un correttivo relativo ai comparti, per sottolineare la diversa rilevanza ecologica delle matrici su cui i saggi sono applicati. La severità è quindi moltiplicata per il fattore della matrice: estratto = 1; elutriato = 2; acqua interstiziale o sedimento disidratato = 3; sedimento tal quale = 4; acqua della colonna o effluente = 5.</li> <li>- Poiché il punteggio del campione calcolato secondo il metodo Hartwell non è un numero relazionabile ad una scala di riferimento e consente di confrontare solo campioni diversi sottoposti alla stessa batteria e non campioni analizzati con batterie diverse, viene proposto il calcolo di un punteggio parziale di rischio per ogni endpoint: (PPRe) = (% risposta) (severità) (matrice) (ccs). Questo valore viene confrontato con il massimo PPR (PPRmax) per ottenere la percentuale di rischio in relazione all'endpoint: PPRe(%) = (%risposta<sub>max,ccsmax</sub>) (PPRe)/PPRmax (espressa in una scala da 0 a 100). Sulla base di queste considerazioni, il punteggio di tossicità (PT) è calcolato come (∑ %PPRe)/√N e il punteggio di rischio totale (PRT), che costituisce il punteggio di tossicità</li> </ul>	

		<p>corretto per la consistenza, come <math>[(\sum \%PPRe) + \text{consistenza}]/\sqrt{N}</math>. In questo modo la media delle percentuali di PPRE di tutti gli endpoint viene ad esprimere una tossicità percentuale (%PT) indipendente dal numero di endpoint. Utilizzando la tossicità percentuale e il punteggio di rischio totale si ottiene la percentuale del punteggio di rischio (%PR) pari a: <math>(\%PT) (PRT/PT)</math>.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Questo approccio stabilisce che il numero minimo di endpoint da includere in una batteria per l'utilizzo dell'indice sia pari a 3.</li> <li>- La traduzione degli indici in scale di tossicità è effettuata mediante giudizio esperto:</li> </ul> <table border="1"> <tr> <td>PT ≤ 5%</td> <td>Tossicità assente/trascurabile</td> <td>%PR ≤ 5%</td> <td>Rischio assente/trascurabile</td> </tr> <tr> <td>5% &lt; PT &lt; 20% e consistenza ≤ 0</td> <td>Tossicità moderata</td> <td>5% &lt; %PR &lt; 10%</td> <td>Rischio moderato</td> </tr> <tr> <td>5% &lt; PT &lt; 20% e consistenza &gt; 0</td> <td>Tossicità elevata</td> <td>10% &lt; %PR &lt; 20%</td> <td>Rischio elevato</td> </tr> <tr> <td>20% &lt; PT &lt; 50%</td> <td>Tossicità molto elevata</td> <td>20% &lt; %PR &lt; 50%</td> <td>Rischio molto elevato</td> </tr> <tr> <td>PT &gt; 50%</td> <td>Tossicità estremamente elevata</td> <td>%PR &gt; 50%</td> <td>Rischio estremamente elevato</td> </tr> </table> <p>Questo indice può essere applicato a qualsiasi batteria, con almeno 3 endpoint diversi e permette di calcolare in modo obiettivo la tossicità e il potenziale di rischio di un campione espressi in una scala derivata da un giudizio esperto.</p>	PT ≤ 5%	Tossicità assente/trascurabile	%PR ≤ 5%	Rischio assente/trascurabile	5% < PT < 20% e consistenza ≤ 0	Tossicità moderata	5% < %PR < 10%	Rischio moderato	5% < PT < 20% e consistenza > 0	Tossicità elevata	10% < %PR < 20%	Rischio elevato	20% < PT < 50%	Tossicità molto elevata	20% < %PR < 50%	Rischio molto elevato	PT > 50%	Tossicità estremamente elevata	%PR > 50%	Rischio estremamente elevato	
PT ≤ 5%	Tossicità assente/trascurabile	%PR ≤ 5%	Rischio assente/trascurabile																				
5% < PT < 20% e consistenza ≤ 0	Tossicità moderata	5% < %PR < 10%	Rischio moderato																				
5% < PT < 20% e consistenza > 0	Tossicità elevata	10% < %PR < 20%	Rischio elevato																				
20% < PT < 50%	Tossicità molto elevata	20% < %PR < 50%	Rischio molto elevato																				
PT > 50%	Tossicità estremamente elevata	%PR > 50%	Rischio estremamente elevato																				

<sup>a</sup> UT: Unità tossiche. E' possibile distinguere due tipi di UT: Unità Tossica acuta che per uno scarico è  $UTa = 100/LC50$  e Unità Tossica cronica,  $UTc = 100/NOEC$  (Dutch Institute for Inland Water and Waste Water Treatment);

<sup>b</sup> La TEC (Threshold Effect Concentration) è la media geometrica tra la concentrazione più bassa in una serie di diluizioni dello scarico, per la quale si osservano effetti avversi sugli organismi (che equivale alla LOEC, Lowest Observed Effect Concentration) e la concentrazione più alta dello scarico che non produce effetto (che equivale alla NOEC, No Observed Effect Concentration). <sup>c</sup> TIF =  $UT_{dw}/LR$ , dove LR è il limite di rilevanza; <sup>d</sup>MSD:

Minimum Significant Difference =  $t_{critico} \sqrt{(s_1^2/n_1) + (s_2^2/n_2)}$ , dove  $t_{critico}$  è il valore di t alla probabilità 0,05 per gli appropriati gradi di libertà;

**Tabella 6 - Peso dei criteri utilizzati per la selezione dei saggi di una batteria per i rifiuti, in funzione di differenti scenari espositivi**

Caratteristiche rilevanti per la selezione dei saggi di una batteria	Caratterizzazione ecotossicologica di base	Gestione di una discarica		Riutilizzo dei rifiuti	
		Discarica di rifiuti	Monitoraggio del percolato	Fanghi in agricoltura	Rifiuti minerali per costruzione di strade
Rapporto costo/rendimento	3	3	3	2	2
Assenza di ridondanza dei risultati	3	3	3	2	2
Capacità di discriminazione tra campioni sottoposti a prova	3	3	1	1	1
Struttura della batteria	Combinazione di differenti livelli trofici	3	3	3	3
	Combinazione di differenti endpoint di valutazione (saggi acuti, cronici, di genotossicità)	3	3	3	3
	Modalità di esposizione (diretta, indiretta)	2	3	3	3
Criteri di selezione dei saggi da includere nella batteria	Rapidità di risposta	1	3	2	2
	Possibilità di implementazioni	3	3	2	2
	Riproducibilità	3	3	2	2
	Convalida	3	3	2	2
	Sensibilità	2	2	3	3
	Rilevanza ecologica	1	3	3	3

Nota: i pesi attribuiti hanno il seguente significato: 3 = caratteristica essenziale; 2= caratteristica importante; 1 = caratteristica secondaria

Per la caratterizzazione ecotossicologica di base di un rifiuto devono quindi essere selezionati saggi con un basso rapporto costo/rendimento e una semplicità di applicazione molto elevata. Come per altre matrici, gli organismi utilizzati devono appartenere a diversi livelli organizzativi dei comparti sia terrestre che acquatico. Appartengono a questo tipo di orientamento tutti gli approcci che si basano sull'adozione di batterie prefissate e vincolanti, composte cioè da saggi raccomandati dotati di protocolli metodologici armonizzati. Con questo criterio viene eliminato il problema della soggettività nella scelta delle combinazioni possibili di saggi, permettendo un reale confronto tra laboratori diversi e una caratterizzazione ecotossicologica *obiettiva* delle matrici investigate, nonché una pianificazione economica spesso utile per gli operatori che devono assolvere compiti istituzionali (ad es. ARPA/APPA). Questi sistemi, dopo un opportuno numero di applicazioni, necessitano di una verifica circa l'effettiva capacità di rilevare tutte le condizioni ambientali, anche quelle critiche, che si possono presentare. In tal senso, essi implicano, attraverso un lavoro di valutazione continua da parte di esperti, un processo di revisione dei protocolli e, se del caso, la sostituzione di saggi e/o di organismi nelle batterie stesse (Baudo et al., 2011).

Il metodo *a posteriori* viene invece applicato ai risultati ottenuti su un numero elevato di saggi biologici. E' questo il caso, ad esempio, dell'identificazione di una batteria attraverso circuito d'interconfronto tra differenti laboratori, come avvenuto nel caso Circuito Internazionale di Interconfronto "Ecotoxicological Characterization of Waste" (descritto nel capitolo 2 di questa pubblicazione) che ha portato alla definizione di una batteria minima composta da tre saggi con organismi acquatici e due saggi con organismi terrestri (Moser and Roembke, 2009).

Un interessante metodo di elaborazione dei risultati ecotossicologici per la definizione di una batteria minima per la caratterizzazione ecotossicologica dei rifiuti, è stato proposto da Pandard et al., 2006 e si basa sull'applicazione delle metodiche dell'analisi statistica multivariata. Gli autori, hanno selezionato dal database francese sui rifiuti ECOTOX ANADEME, i risultati ottenuti su 40 campioni (solidi e lisciviati) cui è stata *routinariamente* applicata una batteria di sei saggi mostrati in tabella 7. Tali risultati, espressi come valori di EC<sub>50</sub> o EC<sub>20</sub>, sono stati elaborati con le tecniche di Analisi dei gruppi (*Cluster Analysis, CA*), Analisi delle Componenti Principali (*Principal Component Analysis, PCA*), *Non Linear Mapping(NLM)* e *Regressione Logistica (Logistic Regression, LR)*.

Lo studio francese ha dimostrato che il numero di saggi ecotossicologici può essere ridotto a tre, senza perdita di informazioni per quanto concerne la valutazione di pericolosità delle matrici di rifiuto analizzate. Una batteria costituita da *Vibrio fischeri*, *Ceriodaphnia dubia* e *Lactuca sativa*, individuata con questo metodo statistico, costituisce un ottimo compromesso per stimare l'ecotossicità dei rifiuti a costo ridotto.

**Tabella 7- Batteria di biosaggi applicata in Francia per la caratterizzazione dei rifiuti**

Organismo	Endpoint	Espressione del risultato	Tipo di tossicità	Metodo utilizzato
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (Alghe)	Inibizione del tasso di crescita	EC <sub>20</sub>	Acuta (3 gg)	UNI EN ISO 8692
<i>Lactuca sativa</i> (Piante)	Emergenza Inibizione di crescita	EC <sub>50</sub>	Acuta (14 gg)	ISO 11269-2
<i>Daphnia magna</i> (Crostei)	Immobilizzazione	EC <sub>50</sub>	Acuta (48 h)	ISO 6341
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (Crostei)	Inibizione della riproduzione	EC <sub>20</sub>	Cronico (7 gg)	NF T 90-376 (AFNOR)
<i>Eisenia fetida</i> (Vermi)	Mortalità	EC <sub>50</sub>	Acuto (14 gg)	ISO 11268
<i>Vibrio fischeri</i> (Batteri)	Inibizione della bioluminescenza	EC <sub>50</sub>	Acuta (30 min.)	ISO 11348-3

Uno studio statistico sovrapponibile a quello francese, condotto da ISPRA AMB LAB, con la cooperazione delle ARPA, appartenenti a un gruppo di lavoro interagenziale, ha prodotto alcuni interessanti risultati in merito all'individuazione di una batteria minima di saggi ecotossicologici per i suoli contaminati. Effettuando le stesse analisi statistiche proposte dal gruppo francese, sui dati provenienti da cinque saggi eseguiti su 29 campioni di suolo contaminato (tabella 8) è stato possibile individuare una batteria minima costituita dal saggio algale con *Pseudokirchneriella subcapitata*, il saggio di germinazione con semi di *Lepidium sativum* e il saggio di mortalità con il collembolo *Folsomia candida* (Balzamo et al., 2010).

**Tabella 8 - Batteria di biosaggi applicata a campioni di suolo contaminato**

Organismo	Endpoint	Espressione del risultato	Tipo di tossicità	Metodo utilizzato
<b>Suolo fase solida</b>				
<i>Heterocypris incongruens</i> (Ostracodi)	Mortalità Inibizione di crescita	M% Ig%	Cronica (6 gg)	Ostracodotoxkit F method
<i>Folsomia candida</i> (Collemboli)	Mortalità Inibizione del tasso riproduttivo	M% Ir%	Cronica (28 gg)	ISO 11267
<i>Cucumis sativus, Lepidium sativum, Sorghum saccharatum</i> (Piante)	Inibizione della germinazione e dell'allungamento radicale	IG%	Acuta (3 gg)	UNICHIM 1651
<b>Elutriato di suolo</b>				
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (Alghe)	Inibizione del tasso di crescita	Igr%	Acuta (3 gg)	UNI EN ISO 8692
<i>Vibrio fischeri</i> (Batteri)	Inibizione della bioluminescenza	Ib %	Acuta (30 min.)	APAT-IRSA-CNR 8030 Man 29/2003

Note: IG: indice di germinazione (IRSA 1983)

Per quanto concerne il problema dell'interpretazione dei risultati di una batteria di saggi applicata ai rifiuti, per il momento la maggior parte degli autori che hanno effettuato studi in tal senso, si è limitata ad applicare gli indici o le scale di tossicità esistenti, elaborati per altre matrici. Ad esempio, Lapa et al., 2002, Schultz et al., 2002, Wilke et al., 2008, Pablos et al., 2011, hanno utilizzato il metodo di aggregazione dei dati denominato "Toxicity Classification System" (TCS) proposto da Persoone et al. 2003. Il metodo TSC è stato sviluppato allo scopo di mettere insieme i dati provenienti da numerosi saggi ecotossicologici, convertendoli in un unico valore che definisce la tossicità globale del campione. I risultati sperimentali dei saggi, espressi come EC/LC<sub>50</sub>, sono convertiti in Unità Tossiche [UT= (1/EC<sub>50</sub>) x 100] e la classificazione viene effettuata, nel metodo semplificato da Lapa et al., 2002, attraverso quattro classi di tossicità:

- Classe I – nessuna ecotossicità osservata. Viene determinato il valore di EC<sub>50</sub> (o IC<sub>50</sub>) di almeno un test, ma il livello di effetto è minore del 50% (UT < 1);
- Classe II – ecotossicità significativa. Viene determinato il valore di EC<sub>50</sub> (o IC<sub>50</sub>) di almeno un test, ma nella diluizione di 10 volte del campione il livello di effetto è minore del 50% (1 ≤ UT < 10);
- Classe III – ecotossicità acuta elevata. Viene determinato il valore di EC<sub>50</sub> (o IC<sub>50</sub>) di almeno un test alla diluizione di 10 volte del campione, ma non alla diluizione di 100 volte (10 ≤ UT < 100);

- Classe IV – ecotossicità molto elevata. Viene determinato il valore di EC<sub>50</sub> (o IC<sub>50</sub>) di almeno un test alla diluizione di 100 volte del campione (TU ≥ 100).

Il procedimento di classificazione viene effettuato in due fasi. Nella prima fase, in base ai risultati ad ogni saggio viene assegnato un punteggio (Test Score, TS) pari a: 1 se UT < 1; 2 se 1 ≤ UT < 10; 3 se 10 ≤ UT < 100; e 4 se TU ≥ 100.

Nella seconda fase, viene calcolata la “classe di punteggio pesato” (Class Weight Score, CWS) attraverso la seguente espressione:

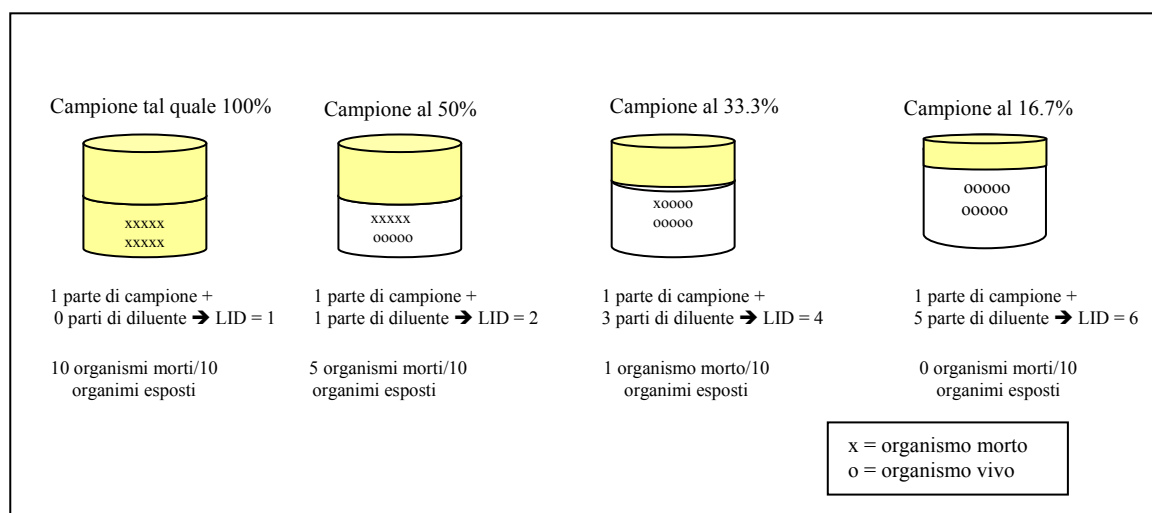
$$CWS = \text{Somma dei punteggi dei diversi saggi} / N^{\circ} \text{ di saggi effettuato}$$

Quanto più è alto il valore del CWS tanto più è elevato il livello di ecotossicità del campione. La variabilità della risposta biologica tra i saggi ecotossicologici è valutata attraverso il calcolo del CWS percentuale, pari a:

$$[CWS (\%) = (CWS / \text{TS più elevato}) \times 100]$$

Quanto più il valore del CWS percentuale si avvicina al 100% tanto più la variabilità della risposta biologica sarà bassa.

In Germania, la valutazione dei risultati di una batteria di biosaggi applicata ai rifiuti viene effettuata utilizzando il valore LID (Lowest Ineffective Dilution) che costituisce il valore di diluizione del campione che non causa nessun ulteriore effetto tossico nel sistema di saggio. Nell'esempio di figura 2 viene mostrato il criterio per l'identificazione del valore LID.



**Figura 2** – Criterio per l'identificazione del valore LID: Nell'esempio mostrato, il valore di diluizione del campione che non causa nessun altro effetto tossico (33,3%) ha un valore LID pari a 4.

Da ogni biosaggio della batteria vengono quindi ottenuti valori LID sui quali si basa l'assegnazione di un valore di tossicità, secondo la scala mostrata nella tabella 9.

**Tabella 9** - Scala di tossicità che utilizza il valore LID

Classe di tossicità	Valutazione	Valore LID *
1	Da non tossico a moderatamente tossico	1 - 10
2	Tossico	> 10-100
3	Molto tossico	> 100

\*Valido in caso per i saggi: alghe, con *Daphnia magna*, con batteri bioluminescenti, con piante e Bacteria contact test

La tossicità più elevata determina la classificazione finale del rifiuto, come mostrato nell'esempio sottostante:

Alghe	Daphnia	Batteri biolum.	Bacteria contact test	Piante	Classificazione finale
2	2	1	3	3	3

---

Vengono stabiliti arbitrariamente e in funzione dei campioni di rifiuto analizzati, i valori LID limite, cioè le diluizioni che definiscono se un campione deve essere classificato o no come ecotossico. Ad esempio, Römcke et al., 2009 per le ceneri pesanti hanno fissato un valore limite pari a  $LID > 8$  per i saggi sul rifiuto solido con organismi terrestri e  $LID > 4$  per i saggi su lisciviato con organismi acquatici.

Il criterio tedesco è analogo a quanto riportato nel Decreto L.vo 152 del 3 Aprile 2006 e successive modifiche, dove, alla nota [5] della tabella 3 dell'Allegato 5 alla parte III, si afferma che “*in caso di esecuzione di più test di tossicità si consideri il risultato peggiore*”.

In generale, la scelta automatica del caso peggiore è estremamente conservativa ed esclude completamente il giudizio esperto basato sul Peso dell'Evidenza (Weight of Evidence, WOE). Il WOE non costituisce né un termine scientificamente ben definito, né un concetto formalizzato condiviso, cioè caratterizzato da strumenti e procedure definite (Weed, 2005). Un approccio basato sull'evidenza implica la valutazione dei valori/pesi relativi delle diverse informazioni/componenti disponibili. A questo scopo, a ciascuna informazione viene assegnato un valore. I pesi/valori possono essere assegnati in maniera obiettiva utilizzando una procedura formalizzata, oppure attraverso il parere di esperti. Il peso dato ad una prova sarà quindi influenzato da fattori quali ad es. la qualità dei dati, la coerenza dei risultati, la natura e la gravità degli effetti, la pertinenza delle informazioni in base all'*endpoint* considerato.

## 2. PROGETTO INTERNAZIONALE D'INTERCONFRONTO SUI RIFIUTI

Il circuito "Valutazione di una batteria di saggi ecotossicologici per la caratterizzazione di rifiuti o eluati di rifiuti mediante un Circuito di Interconfronto", messo a punto come progetto di ricerca nel programma UFOPLAN del Ministero Federale Tedesco per l'Ambiente, Conservazione della Natura e Sicurezza Nucleare, e organizzato dalle Istituzioni elencate in tabella 10 ha visto la partecipazione di 60 laboratori da 15 Paesi diversi.

**Tabella 10 - Principali attività delle Istituzioni tedesche, organizzatrici del circuito d'interconfronto**

Istituzione	Principali attività
Agenzia tedesca per l'Ambiente (UBA, Dessau-Rosslau, Germania)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Organizzazione generale del circuito (comunicazioni tra partecipanti e parti terze; organizzazione del Workshop di apertura del circuito (21-22 Giugno 2006 Berlino, Germania) organizzazione del Convegno finale del circuito (29 Giugno, 2007 Berlino, Germania)</li> <li>• Rapporto finale del circuito (con il supporto del gruppo esperti del CEN)</li> </ul>
Federal Institute for Materials Research and Testing (BAM, Berlino, Germania)	Preparazione, caratterizzazione e distribuzione dei tre rifiuti di prova
ECT Oekotoxikologie GmbH (ECT, Floersheim, Germania)	Coordinamento scientifico del circuito: <ul style="list-style-type: none"> <li>• preparazione delle Procedure Operative Standard (POS) e dei file in Excell</li> <li>• organizzazione di un Workshop (15 dicembre 2006, Berlino, Germania)</li> <li>• compilazione del rapporto finale</li> </ul>
Università delle Scienze Applicate (FH, Giessen-Friedberg, Giessen, Germania)	Valutazione statistica dei risultati del circuito in accordo con la norma ISO 5725-2
Hoelle & Huettner AG (Tuebingen, Germania)	Sviluppo della banca dati comprendente tutta la documentazione del circuito (dati grezzi, risultati, elaborazioni statistiche, ecc) per la valutazione da parte degli esperti

I materiali di prova, selezionati dopo consultazione della Commissione Tecnica CEN TC 292/WG7, sono stati prodotti, caratterizzati e distribuiti dal BAM, utilizzando le seguenti matrici ambientali:

- ceneri (*bottom ash*) fortemente contaminate con metalli pesanti, provenienti da un inceneritore olandese di rifiuti di origine urbana; codificato come INC;
- suolo contaminato da idrocarburi policiclici aromatici, proveniente da un sito (nei pressi di Berlino) in cui era localizzato un impianto per la produzione del gas; codificato come SOI.
- legno costituito da una miscela di rifiuti legnosi trattati con conservanti a base di rame e non trattati provenienti da un impianto di trattamento del legname; codificato come WOO.

La selezione delle matrici per l'esecuzione delle misure ecotossicologiche segue un criterio diverso rispetto alle necessità di una determinazione chimico-analitica. La risposta ecotossicologica, infatti, deve essere anticipata da un giudizio esperto sulla base delle conoscenze generali disponibili sui substrati prescelti. L'obiettivo perseguito dagli organizzatori del circuito fu quello di selezionare differenti tipologie di matrici di rifiuto che riflettessero una diversa risposta ecotossicologica ai metodi utilizzati e venne quindi tenuto conto della rilevanza della matrice, degli inquinanti presenti, della disponibilità di metodiche per la sua preparazione e della possibilità di spedizione ai partecipanti (Becker et al., 2009).

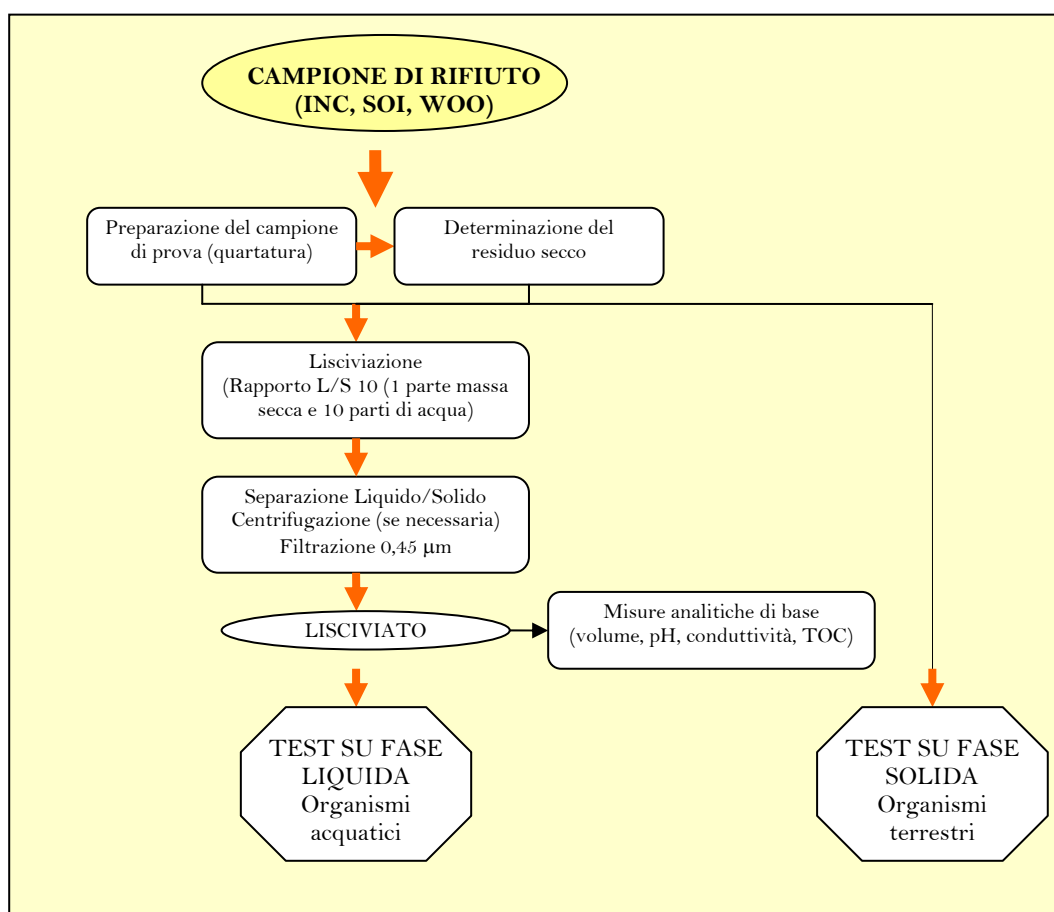
I risultati della caratterizzazione per i componenti maggiori di INC, SOI e WOO, effettuata dal BAM, sono mostrati in tabella 11. I tre materiali, INC, SOI e WOO in forma solida, essiccati, macinati (dimensioni delle particelle < 4 mm) e privi di composti volatili sono stati quindi spediti ai laboratori partecipanti in quantità sufficiente all'esecuzione dei diversi saggi ecotossicologici.

**Tabella 11 - Caratterizzazione dei 3 substrati di rifiuto INC, SOI e WOO**

Parametro misurato	Metodo	Quantità di sostanza misurata	INC	SOI	WOO
pH (26,5 °C)	ISO 10390		10,42 ± 0,04	8,36 ± 0,02	5,41 ± 0,04
C: H: N (%)	-	100 mg	C 1,16 ± 0,989	C 4,98 ± 2,47	C 46,44 ± 0,4
			N 0,035 ± 0,002	N 0,085 ± 0,028	N 0,277 ± 0,091
Carbonio totale (%)	-	80 mg	H 0,423 ± 0,002	H 0,304 ± 0,028	H 6,535 ± 0,044
			-	2,73 ± 0,99	37,4 ± 1,12
Carbonio totale inorganico (%)	-	80 mg	-	0,099 ± 0,004	< 0,2
Contenuto d'acqua (%)	ISO 11465	5 g	2,08 ± 0,28	0,980 ± 0,014	8,77 ± 0,11
Contenuto d'acqua (%)	Titolazione di Karl-Fischer	50 mg	1,99 ± 0,04	1,29 ± 0,68	8,23 ± 0,10
Idrocarburi petroliferi totali (mg/Kg)	ISO 16703	5 g	-	152 ± 30	-

Tabella tradotta e modificata da Becker et al., 2009.

Ogni laboratorio ha effettuato la lisciviazione dai materiali INC, SOI e WOO, la caratterizzazione del lisciviato e la preparazione delle soluzioni per l'esecuzione dei saggi ecotossicologici come indicato dalle Procedure Operative Standard (POS) inviate dagli organizzatori del circuito, elaborate in base alla norma EN 14735:2005. Uno schema dei principali trattamenti eseguiti è mostrato in figura 3.



**Figura 3 – Schema dei trattamenti eseguiti dai laboratori partecipanti al Circuito**

In virtù del lavoro svolto dal WG7 della Commissione Tecnica CEN 292 in merito ai criteri di selezione (metodo normato, prova con tossico di riferimento, sensibilità, ecc) dei saggi ecotossicologici da includere in una batteria per la caratterizzazione dei rifiuti e quindi in base alla lista stabilita nell'allegato B alla norma EN 14735:2005, vennero individuate due tipologie di gruppi di saggi da effettuare nell'interconfronto:



- 1) una batteria di base costituita da cinque saggi (tre con organismi acquatici e due con organismi terrestri) comunemente utilizzati per la qualità delle acque di scarico e per i suoli (tabella 12)
- 2) un gruppo di dieci saggi aggiuntivi, considerati potenzialmente appropriati per la determinazione dell'ecotossicità dei rifiuti (tabella 13).

**Tabella 12 - Batteria di base**

Nome del saggio	Specie	Norma di riferimento
<u>Saggi biologici da eseguire con i lisciviati dei tre campioni di rifiuto</u>		
Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of <i>Vibrio fischeri</i> (Luminescent bacteria test)	Batteri: <i>Vibrio fischeri</i>	EN ISO 11348- 1, 2, 3
Determination of the inhibition of the mobility of <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea)	Crostacei: <i>Daphnia magna</i>	ISO 6341
Freshwater algal growth inhibition test with <i>Desmodesmus subspicatus</i> and <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Alghe monocellulari: <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> <i>Desmodesmus subspicatus</i>	ISO 8692
<u>Saggi biologici da eseguire con i rifiuti solidi</u>		
Effects of pollutants on earthworms ( <i>Eisenia fetida</i> ) – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate	Vermi (Anellidi, Lombrichi): <i>Eisenia fetida</i> , <i>Eisenia andreii</i>	ISO 11268-1
Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants	Piante: <i>Avena sativa</i> <i>Brassica rapa</i>	ISO 11269-2

Tabella tradotta e modificata da Römbke et al., 2009.

**Tabella 13 - Saggi aggiuntivi**

Nome del saggio	Specie	Norma di riferimento
<u>Saggi biologici da eseguire con i lisciviati dei tre campioni di rifiuto</u>		
Duckweed growth inhibition - Determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed	Macrofitte: <i>Lemna minor</i>	ISO 20079
Determination of chronic toxicity to <i>Brachionus calyciflorus</i> in 48 h – Population growth inhibition test	Rotiferi planctonici: <i>Brachionus calyciflorus</i>	ISO 20666
<i>Pseudomonas putida</i> growth inhibition test (Pseudomonas cell multiplication inhibition test)	Batteri: <i>Pseudomonas putida</i>	ISO 10712
Determination of chronic toxicity to <i>Ceriodaphnia dubia</i> in 7 days – Population growth inhibition test	Crostacei: <i>Ceriodaphnia dubia</i>	AFNOR 90-376; ISO/NWI 20665
Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu test	Batteri: <i>Salmonella typhimurium</i>	ISO 13829
<u>Saggi biologici da eseguire con i rifiuti solidi</u>		
Effects of pollutants on earthworms ( <i>Eisenia fetida</i> ) – Part 2: Determination of effects on reproduction	Vermi (Anellidi, Lombrichi): <i>Eisenia fetida</i> <i>Eisenia andreii</i>	ISO 11268-2
Enchytraeid reproduction test	Vermi (Anellidi, Oligocheti): <i>Enchytraeus albidus</i> <i>Enchytraeus crypticus</i>	ISO 16387
Effects of pollutants on collembola ( <i>Folsomia candida</i> ) – Method for the determination of effects on reproduction	Collemboli, Esapodi: <i>Folsomia candida</i>	ISO 11267
Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour – Part 1: Test with earthworms <i>Eisenia fetida</i> and <i>Eisenia andreii</i>	Vermi (Anellidi, Lombrichi): <i>Eisenia fetida</i> <i>Eisenia andreii</i>	ISO 17512
German standard methods for the examination of water, waste water and sludge – Bioassays (group L) – Part 48: <i>Arthrobacter globiformis</i> toxicity test for polluted solid material	Batteri: <i>Arthrobacter globiformis</i>	DIN 38412-48

Tabella tradotta e modificata da Römbke et al., 2009.

Ai laboratori partecipanti venne richiesto di effettuare la lisciviazione e almeno tre saggi ecotossicologici della batteria di base. I saggi aggiuntivi erano da considerarsi su base volontaria.

---

Per l'esecuzione delle prove (lisciviazione e saggi ecotossicologici) ad ogni laboratorio partecipante vennero fornite le procedure operative (SOP) nelle quali erano specificati, ad esempio, i parametri chimico-fisici per la caratterizzazione dei lisciviati e l'intervallo entro cui selezionare i fattori di diluizione per i vari organismi test. In particolare era richiesta la determinazione dei seguenti parametri: pH, contenuto di carbonio organico totale (TOC), conducibilità, concentrazione in massa di alcuni metalli (diversi per ogni rifiuto) e di alcune sostanze organiche. Erano inoltre allegati alle SOP, i moduli per l'inserimento dei risultati e per la raccolta delle informazioni necessarie alla loro valutazione da parte degli organizzatori del circuito. Tra le informazioni richieste vi erano: il metodo di saggio, i tossici di riferimento, i valori dei parametri di mantenimento degli organismi (ad es. temperatura, fotoperiodo, concentrazione di ossigeno, pH) che avrebbero potuto influenzare la variabilità dei risultati delle prove e i dati relativi al sistema di qualità utilizzato dal laboratorio nella valutazione dell'affidabilità dei risultati ottenuti.

I risultati inviati da ciascun laboratorio partecipante erano giudicati accettabili e quindi inclusi nella valutazione statistica e grafica solo se rispondevano positivamente al procedimento di valutazione graduale costituito da tre fasi (Donnevert et al., 2009):

- 1) Conformità con i criteri di validità dati nelle linee guida (o nelle norme di riferimento).
- 2) Esecuzione del saggio in accordo alla SOP (una non chiara conformità alla SOP era criterio di eliminazione del risultato).
- 3) I risultati dei saggi con i tossici di riferimento compresi negli intervalli di concentrazione previsti (quest'ultimo criterio di accettabilità del risultato è stato applicato in modo stringente nei saggi con *Eisenia fetida* (vermi) e *Daphnia magna*, parzialmente nel saggio algale e non è stato usato nei saggi con piante. In particolare, nel caso del saggio algale, sulla base dell'esperienza dell'interconfronto stesso e dopo una consultazione con i rappresentanti delle DIN/ISO, l'intervallo di concentrazioni dei tossici di riferimento è stato ampliato).

Tutti i risultati di  $EC_{50}/LC_{50}$  ritenuti validi secondo l'approccio sopra menzionato vennero ricalcolati con un unico metodo (analisi dei Probit) mediante il software ToxRat (2006). I valori di  $EC_{50}/LC_{50}$  trasformati in logaritmo vennero quindi utilizzati, al posto di quelli originari, per calcolare medie e scarto tipo (ST). La valutazione dello scarto tipo di ripetibilità (sr) e dello scarto tipo di riproducibilità (Sr) venne effettuata secondo la norma ISO 5725-2. Essa costituisce il riferimento più importante per la convalida di un metodo attraverso esperimenti che coinvolgono laboratori differenti (circuiti d'interconfronto o *ring test*) ed è specifica per le analisi chimiche e fisico-chimiche. Nel caso della valutazione di dati ecotossicologici, sia perché i valori di  $EC/LC_{50}$  non seguono una distribuzione normale, ma log-normale e sia, nel caso specifico di questo interconfronto, perché non tutti i laboratori hanno eseguito repliche dei saggi, sono risultati necessari alcuni adattamenti della norma. Per i dettagli si veda la tabella 4.1 in Donnevert et al., 2009.

La precisione dei risultati del circuito venne valutata principalmente con il metodo del *Warning limit approach* (Environment Canada, 2005) originariamente sviluppato per l'interpretazione dei risultati di un singolo laboratorio e modificato.

Questo metodo consiste nel confrontare, per ciascun saggio ecotossicologico, i risultati di ogni laboratorio con il valore di consenso di  $EC_{50}/LC_{50}$ , calcolato come media geometrica (media dei valori trasformati in log), più o meno 2 ST a costituire il limite di allarme superiore e inferiore (*upper warning limit* e *lower warning limit*). La rappresentazione grafica è costituita da una *warning chart*.

## 2.1 Risultati delle batterie di saggi ecotossicologici

### 2.1.1 Tossici di riferimento

L'esecuzione dei saggi con i rispettivi tossici di riferimento, parallela a quella con i campioni di prova, è raccomandata dalla maggior parte delle procedure per valutare la sensibilità degli organismi-test e i risultati devono situarsi nell'intervallo di concentrazioni previsto dal metodo. Nell'ambito del circuito d'interconfronto questo requisito è stato rispettato quasi totalmente per i saggi della batteria di base, mentre spesso è mancante nel caso dei saggi addizionali (perché facoltativo).

I risultati dei saggi eseguiti con i tossici di riferimento, analizzati separatamente da quelli ottenuti sui 3 campioni di rifiuto, sono mostrati nelle tabelle 14 e 15.

**Tabella 14 - Risultati dei saggi eseguiti con i tossici di riferimento (organismi acquatici)**

Organismo	N° risultati accettati	Tossico di riferimento	Espressione del risultato	Risultati del circuito (valori medi) (mg/L)	Intervallo di concentrazioni di riferimento (mg/L)
<b>Batteria di base</b>					
Alghe: <i>D. subspicatus</i>	45	Dicromato di K	EC <sub>50</sub> 72 h	0,79 ± 0,25	0,39 – 1,43
Alghe: <i>P. subcapitata</i>		Dicromato di K	EC <sub>50</sub> 72 h	1,10 ± 0,48	0,38 – 2,60
Crostacei: <i>D. magna</i>	46	Dicromato di K	EC <sub>50</sub> 24 h	1,24 ± 0,32	0,6 – 2,1
Batteri lum.: <i>V. fischeri</i> (liquidi e freschi)	1	3,5 Diclorofenolo	EC <sub>50</sub> 30 m	4,13	6,0 <sup>a</sup>
	1	Solfato di Zn eptaidrato	EC <sub>50</sub> 30 m	29,70	109,9 <sup>a</sup>
	6	Dicromato di K	EC <sub>50</sub> 30 m	4,18	11,3 <sup>a</sup>
	4	3,5 Diclorofenolo	EC <sub>50</sub> 30 m	4,03	3,4 <sup>a</sup>
Batteri lum.: <i>V. fischeri</i> (congelati)	5	Solfato di Zn eptaidrato	EC <sub>50</sub> 30 m	5,76	9,67 <sup>a</sup>
	8	Dicromato di K	EC <sub>50</sub> 30 m	27,0	52,9 <sup>a</sup>
<b>Saggi addizionali</b>					
Macrofite: <i>L. minor</i>	7	3,5 Diclorofenolo	EC <sub>50</sub>	2,77 ± 0,44	1,8 – 3,6
Rotiferi: <i>B. calyciflorus</i>	4	Solfato di rame (Cu <sup>2+</sup> )	EC <sub>50</sub>	28,40 ± 13,05	35,8 - 71,2
	2	Dicromato di K	EC <sub>50</sub>	4,84	non disponibile
Crostacei: <i>C. dubia</i>	4	Pentaclorofenolato di Na	EC <sub>50</sub>	0,300 ± 60	0,216-0,344
Batteri: <i>P. putida</i>	3	3,5 Diclorofenolo	EC <sub>50</sub>	17,82	10 - 30

<sup>a</sup> Concentrazioni che provocano un'inibizione della luminescenza dal 20% all'80% dopo 30 minuti

**Tabella 15 - Risultati dei saggi eseguiti con i tossici di riferimento (organismi terrestri)**

Organismo	N° risultati accettati	Tossico di riferimento	Espressione del risultato	Risultati del circuito (valori medi) (mg/Kg)	Intervallo di concentrazioni di riferimento (mg/Kg)
<b>Batteria di base</b>					
Vermi: <i>E. fetida</i> , <i>E. andreei</i> (mortalità)	15	Cloroacetamide	LC <sub>50</sub>	34,89	20 – 80
	1	Carbendazim	LC <sub>50</sub>	0,9	1 – 5
Piante: <i>B. rapa</i>	5	Acido bórico	EC <sub>50</sub>	187,64	100 - 400
Piante: <i>A. sativa</i>	4	Acido bórico	EC <sub>50</sub>	271,83	100 - 400
<b>Saggi addizionali</b>					
Vermi: <i>E. fetida</i> , <i>E. andreei</i> (riproduzione)	1	Carbendazim	EC <sub>50</sub>	2,7	1 – 5
	2	Dicromato di K	EC <sub>50</sub>	388	336,3
Collemboli: <i>F. candida</i> (riproduzione)	2	Phenmedipham	EC <sub>50</sub>	90,95	15 – 30
Enchitreidi: <i>E. albidus</i>	1	Carbendazim	EC <sub>50</sub>	22,4	1,2 ± 0,8
	1	Acido bórico	EC <sub>50</sub>	46,0	non disponibile

Nelle prove con organismi acquatici (batteria di base), il numero di risultati con i tossici di riferimento, soprattutto con dicromato di potassio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), è stato talmente consistente da permettere, in alcuni casi, la rivalutazione degli intervalli di concentrazione riportati dalle linee guida. Ad es., nel caso del saggio algale, i valori di riferimento per il dicromato di potassio, raccomandati dalla ISO 8692:2004, provengono da gruppi di dati molto vecchi. I risultati dell'interconfronto (*D. subspicatus* 0,79 ± 0,25 mg/L; *P. subcapitata* 1,10 ± 0,48 mg/L; entrambe le specie: 0,97 ± 0,43 mg/L) quindi, come pure altre esperienze (Chao & Chen 2000), sono stati inseriti nel processo di revisione della norma suddetta. La supposta maggiore sensibilità della specie algale *Desmodesmus* rispetto a *Pseudokirchneriella*, non viene confermata da questi risultati che, al contrario, non mostrano differenze significative nella risposta al dicromato (Pattard and Moser, 2009).

Per quanto riguarda le prove con organismi terrestri, i risultati ottenuti nel saggio di mortalità con *Eisenia fetida*/*Eisenia andreei*, indicano che il composto (cloroacetamide) raccomandato dalla norma ISO 11268-1, è tossico e dovrebbe essere sostituito o, almeno, dovrebbe essere ristretto e diminuito l'intervallo di concentrazioni di riferimento da 20-80 mg/Kg a 10-50 mg/Kg. Per i saggi che utilizzano come tossici di riferimento i pesticidi (Carbendazim, Phenmedipham) viene proposta la sostituzione con acido bórico.

### 2.1.2 Rifiuti

In merito ai saggi ecotossicologici della batteria di base eseguiti sui tre campioni di rifiuto, sono pervenuti agli organizzatori del circuito i risultati di 634 prove. Il numero delle prove ritenute valide (546, pari all'85,7% del totale) per ogni tipologia di saggio e di rifiuto, è riportato nella tabella 16. La percentuale di risultati accettati è stata molto elevata, variando da un minimo di 74,1 % (saggio algale) a un massimo di 92,6 % (*D. magna*).

**Tabella 16 – Risultati ritenuti validi per ogni tipologia di saggio della batteria di base e per ogni rifiuto**

Tipo di prova	N° tot di prove effettuate	N° prove accettate per i diversi rifiuti			N° tot di prove accettate	Risultati accettati %
		INC	SOI	WOO		
Alghe ( <i>D. subspicatus</i> , <i>P. subcapitata</i> )	143	35	35	36	106	74.1
Crostacei ( <i>D. magna</i> .)	161	47	51	51	149	92.6
Batteri luminescenti ( <i>V. fischeri</i> .)	154	45	42	53	140	90.9
Piante ( <i>A. sativa</i> , <i>B. rapa</i> .)	124	37	35	35	107	86.3
Vermi ( <i>E. fetida</i> , <i>E. andreei</i> .)	52	14	15	15	44	84.6
Totale	<b>634</b>	178	178	190	<b>546</b>	85.7

I risultati finali complessivi della batteria di base applicata ai tre rifiuti, espressi come medie aritmetiche dei valori di LC/EC<sub>50</sub> (% di rifiuto), sono mostrati nella tabella 17.

**Tabella 17 - Risultati finali complessivi della batteria di base applicata ai tre rifiuti**

Saggio	Organismo	LC/EC50 (% rifiuto)		
		INC	SOI	WOO
Freshwater algal growth inhibition test with <i>D.esmodesmus subspicatus</i> and <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Alghe ( <i>D. subspicatus</i> )	8,80	>100	1,34
	Alghe ( <i>P. subcapitata</i> )	2,42	>100	0,22
	Alghe tutte	4,08	56,5	0,50
Determination of the inhibition of the mobility of <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea)	Crostacei ( <i>D. magna</i> .)	2,71	>100	0,38
Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of <i>Vibrio fischeri</i> (Luminescent bacteria test)	Batteri luminescenti ( <i>V. fischeri</i> ) congelati	30,8	65,8	0,73
	Batteri luminescenti ( <i>V. fischeri</i> ) liquidi/freschi	n.a.	n.a.	5,60
	Batteri luminescenti ( <i>V. fischeri</i> ) tutti	35,4	65,5	2,56
Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants	Piante ( <i>A. sativa</i> .)	29,4	57,8	10,0
	Piante ( <i>B. rapa</i> .)	23,9	63,0	2,64
Effects of pollutants on earthworms ( <i>Eisenia fetida</i> ) – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate	Vermi ( <i>E. fetida</i> / <i>E. andreei</i> .)	45,5	>100	20,1

L'esecuzione dei saggi della batteria di base in generale non ha presentato problemi ai laboratori, sebbene molti di essi non avessero alcuna esperienza di applicazione con campioni di rifiuto. Complessivamente, per ogni tipologia di substrato (solido o lisciviato) e per ogni sistema di saggio, la scala di tossicità dei tre rifiuti è risultata sempre uguale con WOO maggiormente tossico, INC con tossicità intermedia e SOI con bassa tossicità. In particolare, con il campione INC il crostaceo *D. magna*. ha evidenziato una sensibilità maggiore (2,71%) rispetto alle due specie algali considerate insieme (4,08%), SOI è risultato tossico per i batteri bioluminescenti (35,4%), ma innocuo per alghe e crostacei (>100%) e solo WOO è risultato molto tossico per tutti gli organismi acquatici e terrestri.

Per quanto concerne il test algale il risultato più evidente è l'elevata differenza di sensibilità tra le due specie, con *P. subcapitata* quattro volte (rifiuto INC: 2,42% vs 8,80%) e cinque volte (rifiuto WOO 0,22 vs 1,34) più sensibile di *D. subspicatus*. Questa differenza non viene tuttavia confermata nei saggi con il tossico di riferimento (tabella 14).

Nel saggio con i batteri bioluminescenti sono state rilevate differenze di sensibilità in funzione dell'origine e della conservazione del ceppo di *V. fischeri* (batteri coltivati in laboratorio in terreno liquido o solido oppure batteri congelati). Con il rifiuto più tossico, WOO, la sensibilità dei batteri congelati è risultata cinque volte maggiore (EC<sub>50</sub>= 0,73%) rispetto ai batteri freschi coltivati in laboratorio (EC<sub>50</sub>= 5,60%)

In merito ai saggi con organismi terrestri, sia nel caso dei vermi di terra *E. fetida* e *andreei*, che delle piante, *A. sativa* e *B. rapa*, i laboratori partecipanti hanno avuto difficoltà a mantenere livelli ottimali di umidità dei campioni di rifiuto solido durante le prove.

Poiché la letteratura scientifica (Wilke et al., 1998; Kalsch et al., 2006) ha più volte evidenziato la maggiore sensibilità allo stress chimico di *B. rapa* rispetto ad *A. sativa* e anche a causa della differente tassonomia e fisiologia delle due specie, i risultati sono stati elaborati separatamente. I valori di tossicità ottenuti, evidenziano tuttavia differenze di sensibilità solo con due (WOO e SOI) dei tre campioni di rifiuto.

### 2.1.3 Toxkit Microbiotests

Dodici dei 60 laboratori partecipanti, hanno effettuato i saggi di Daphnia, Alghe e Rotiferi, utilizzando i “Toxkit microbiotests” Daphtoxkit (*D. magna*), Algaltoxkit (*P. subcapitata*) e Chronic Rotoxkit (*B. calyciflorus*), che, impiegando forme dormienti o inattive delle specie-test, non necessitano di coltura e mantenimento degli organismi. Nella tabella 18 sono riassunti, per ciascuna tipologia di rifiuto e di saggio, il numero di prove ritenute valide.

**Tabella 18 - Accettabilità dei saggi biologici eseguiti con i Toxkit Microbiotest**

Substrato	Algaltoxkit	Daphtoxkit	Chronic Rotoxkit
INC	7 (5)	11 (8)	4 (4)
SOI	7 (7)	11 (11)	3 (3)
WOO	7 (6)	11 (11)	3 (3)
Somma	21 (17)	33 (30)	5 (3)

( ) N° di prove accettate

Dei 64 risultati presentati, 57 (89,1%) furono considerati accettabili. I valori medi di EC<sub>50</sub> (%) e i relativi coefficienti di variazione (CV) ottenuti con i tre diversi Toxkit, messi a confronto con quelli dei saggi eseguiti secondo il metodo tradizionale (Persoone and Wadhia, 2009) sono mostrati in tabella 19.

I valori medi di EC<sub>50</sub> per i tre kit considerati, sebbene calcolati su un numero di laboratori inferiore, sono dello stesso ordine di grandezza di quelli ottenuti con i metodi tradizionali. I CV con entrambi i metodi, kit e tradizionale, mostrano valori piuttosto elevati per Alghe e *Daphnia*, superiori al limite massimo di variabilità pari al 30% indicato nel riferimento Environment Canada, 2005. Tale limite tuttavia è stabilito per i saggi eseguiti con sostanze chimiche pure e, come sottolineato da molti autori (Persoone and Wadhia, 2009) non può essere applicato integralmente alla valutazione di matrici complesse come i rifiuti. La variabilità dei kit è risultata inferiore a quella dei saggi tradizionali nella quasi totalità dei casi riportati.

**Tabella 19 – Confronto tra la variabilità ottenuta con i metodi tradizionali rispetto ai kit.**

Substrato	Test algale		Algaltoxkit	
	N° lab	EC <sub>50</sub> (CV%)	N° lab	EC <sub>50</sub> (CV%)
INC	17	3,31 (94%)	5	4,24 (79%)
SOI	14	> 100 (n.a.)	7	> 100 (n.a.)
WOO	16	0,42 (151%)	6	0,36 (93%)

Substrato	Test con Daphnia		Daphtoxkit	
	N° lab	EC <sub>50</sub> (CV%)	N° lab	EC <sub>50</sub> (CV%)
INC	39	3,32 (55%)	8	2,41 (41%)
SOI	40	> 100 (n.a.)	11	> 100 (n.a.)
WOO	40	0,42 (90%)	11	0,61 (32%)

Substrato	Test con Rotiferi		Rotoxkit	
	N° lab	EC <sub>50</sub> (CV%)	N° lab	EC <sub>50</sub> (CV%)
INC	3	4,44 (25%)	4	5,35 (16%)
SOI	3	> 100 (n.a.)	3	> 100 (n.a.)
WOO	3	0,09 (29%)	3	0,13 (40%)

### 2.1.4 Saggi addizionali

Per quanto riguarda i saggi addizionali (5 con organismi acquatici e 5 con organismi terrestri), sono pervenuti 196 risultati. A causa della minore applicazione di questi metodi rispetto a quelli tradizionali della batteria di base, e dell'assenza di POS specifiche, l'accettabilità dei dati fu valutata caso per caso ed è mostrata nella tabella 20.

**Tabella 20 - Risultati ritenuti validi per ogni tipologia di saggio addizionale**

Organismo	N° tot di prove effettuate			N° di prove accettate		
	INC	SOI	WOO	INC	SOI	WOO
Macrofite ( <i>L. minor</i> )	16	16	19	10	12	13
Rotiferi ( <i>B. calyciflorus</i> )	3	3	3	3	3	3
Batteri ( <i>P. putida</i> )	4	4	4	3	3	3
Crostacei ( <i>C. dubia</i> )	4	3	3	4	3	3
Umu genotossicità	7	7	9	7	6	8
Vermi ( <i>E.fetida</i> e <i>andreei</i> .) riproduzione	6	6	5	4	4	4
Enchitreidi (riproduzione)	4	4	4	4	3	4
Collemboli ( <i>F. candida</i> .)	7	7	7	6	6	6
Test di fuga ( <i>E.fetida</i> e <i>andreei</i> )	3	4	5	3	4	5
Batteri ( <i>A. globiformis</i> .)	8	10	10	7	9	9
<b>Totale</b>	<b>62</b>	<b>64</b>	<b>69</b>	<b>51</b>	<b>35</b>	<b>58</b>

Ad eccezione del saggio con la specie acquatica *Lemna minor* (51), i dati relativi agli altri test sono stati relativamente pochi, per cui non è stato possibile effettuare misure di riproducibilità. I valori medi di EC<sub>50</sub> ottenuti sui tre rifiuti sono mostrati in tabella 21.

**Tabella 21 – Valori medi di EC<sub>50</sub> (%) ottenuti nei diversi saggi addizionali**

Organismo	EC <sub>50</sub> (%)		
	INC	SOI	WOO
Macrofite ( <i>L. minor</i> )	n.v.	>90	1,70
Rotiferi ( <i>B. calyciflorus</i> )	4,44	> 100	0,09
Batteri ( <i>P. putida</i> )	11,7	n.e.	0,14
Crostacei ( <i>C. dubia</i> )	4,78	n.v.	0,08
Umu genotossicità	n.v.		
Vermi ( <i>E.fetida</i> e <i>andreei</i> .) riproduzione	16,1	50	4,1
Enchitreidi (riproduzione)	28,7	>100	13,2
Collemboli ( <i>F. candida</i> .)	26,0	47,9	5
Test di fuga ( <i>E.fetida</i> e <i>andreei</i> )	13,67	n.v.	2,9
Batteri ( <i>A. globiformis</i> .)	22,6	12,4	0,6

Anche con i saggi addizionali è stata riscontrata una tossicità elevata con il rifiuto WOO, una tossicità intermedia con il rifiuto INC e una debole tossicità con il rifiuto SOI. Tra le prove effettuate con i lisciviati, i saggi con *Ceriodaphnia dubia* e *Brachionus calyciflorus*, seguiti da *Pseudomonas putida*, sono risultati i più sensibili per tutte e tre le tipologie di rifiuto. Da questo punto di vista questi tre saggi potrebbero costituire una valida alternativa a quelli proposti nella batteria di base. Il saggio con *Lemna minor* sebbene sia risultato il meno sensibile, potrebbe fornire informazioni utili, relativamente alla tossicità per gli organismi autotrofi, in caso di lisciviati colorati o torbidi che non possono essere valutati con il test algale.

Tra i saggi eseguiti sui rifiuti solidi, il test di riproduzione con Enchitraeidi è risultato il meno sensibile, mentre il test di fuga con *Eisenia fetida*. e, soprattutto, il test di contatto con il batterio *Arthrobacter globiformis* sono risultati molto sensibili. Questi dati sono di particolare importanza, infatti i saggi sopra menzionati sono, tra quelli con organismi terrestri, i più rapidi (1-2 giorni). D'altra parte i tre saggi di tossicità cronica (test di riproduzione 28-56 giorni) con vermi, Enchitraeidi e Collemboli sono risultati molto robusti.

---

## 2.2. Caratterizzazione di base: correlazione tra i saggi ecotossicologici e la modellizzazione della speciazione chimica nel lisciviato dei rifiuti

I rifiuti su cui sono stati condotti i saggi ecotossicologici sono stati sottoposti a caratterizzazione mediante due prove di lisciviazione sviluppate dal CEN/TC292/WG6 e descritte nei rapporti tecnici TS 14429 (Influenza del pH sulla lisciviazione) e TS 14405 (test di percolazione) (H.A van der Sloot and A. Van Zomeren, 2009). Queste due tipologie di lisciviazione permettono di fornire informazioni sulla speciazione chimica dei composti in soluzione evidenziando quali sono le specie “libere” e quindi disponibili agli organismi utilizzati nei saggi ecotossicologici. La combinazione delle informazioni derivanti da queste due procedure di lisciviazione permettono una migliore valutazione della risposta ecotossicologica; questo perché l’effetto ecotossicologico è correlato in modo evidente alla concentrazione biodisponibile piuttosto che al contenuto totale di inquinanti nel rifiuto che, ancora, alle concentrazioni in massa totali nell’eluato. La “biodisponibilità” in questo contesto può essere definita come la quantità dei composti presenti in forma ionica o in forma non legata come, ad esempio, i microinquinanti organici non associati al DOC o non presenti sotto forma di colloid.

Dall’analisi dei dati di lisciviazione per i tre rifiuti utilizzati nell’Interconfronto Internazionale, è stata verificata, mediante la modellizzazione con LeachXS-Orchestra, la ripartizione degli inquinanti tra la forma libera in soluzione, quella legata al DOC disciolto e quella legata alla fase solida, quest’ultima intesa come particolato in sospensione. Il DOC è la somma di tutte le specie contenenti carbonio organico in soluzione, ma non tutti i composti presenti nel DOC sono reattivi nel legare i metalli o i composti organici; ad esempio, per i metalli, il DOC è nella forma maggiormente reattiva quando si trova a pH bassi o molto alti, mentre a pH neutro solo una più bassa porzione di DOC è reattiva nel legare metalli. In particolare, sono state calcolate le quantità delle diverse forme ioniche, che rappresentano le forme “libere” e quindi biodisponibili, in cui sono presenti il Cu (ad es.  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Cu}(\text{OH})^{+}$ ,  $\text{CuCl}^{+}$ ,  $\text{CuCl}_3^{-}$ ) e il Cr nei tre rifiuti analizzati. Il Cu sembra essere la causa principale di tossicità, specialmente nel legno WOO e secondariamente nelle ceneri INC. La bassa tossicità rilevata per il suolo contaminato SOI, si spiega sulla base della forte associazione dei microinquinanti organici (principalmente IPA) con il DOC.

E’ stata inoltre calcolata la ripartizione degli elementi dopo l’aggiunta del medium di controllo al lisciviato, e si è visto che tale ripartizione cambia significativamente. Con la diluizione cambiano, infatti, le proporzioni tra la concentrazione in massa del Cu, i livelli di Ca in soluzione e quelli di DOC, risultando in una tossicità più alta. La tossicità calcolata nelle diluizioni non è, quindi, sempre rappresentativa della tossicità nel campione non diluito, per cui la scelta di una diluizione rappresentativa gioca un ruolo importante nella valutazione della tossicità.

Da ciò deriva che, prima di prendere decisioni sul trattamento, smaltimento o riuso dei rifiuti, e valutare la caratteristica di pericolosità H14, è importante definire il rapporto L/S in cui fare i saggi ecotossicologici.

Le principali conclusioni che si possono trarre dall’analisi condotta in occasione del circuito d’interconfronto, sono:

- la combinazione dell’analisi chimica e dei modelli predittivi del comportamento alla lisciviazione dei rifiuti sono uno strumento potente;
- il modello di speciazione dimostra cambiamenti nella misura della tossicità anche a seguito della diluizione del lisciviato con il medium per la conduzione dei biotest. Effetti d’interazione dovuti alla competizione con il DOC, all’aumento dei livelli del Ca con un conseguente aumento della biodisponibilità del Cu rispetto all’eluato non diluito, provocano un aumento dei valori di  $\text{EC}_{50}$ ;
- la norma EN 14735 non è stata sviluppata per valutare l’ecotossicità dei microinquinanti organici. Ulteriori sviluppi dovranno risolvere questa limitazione. Inoltre, è importante indagare ulteriormente le conseguenze della filtrazione o della centrifugazione dell’eluato poiché possono influenzare i livelli di DOC e di colloid in soluzione; come abbiamo già evidenziato questi due parametri influenzano la tossicità degli inquinanti presenti nell’eluato.

---



---

### **3. BATTERIE DI TEST PER LA CARATTERIZZAZIONE ECOTOSSICOLOGICA DEI RIFIUTI**

L'analisi della bibliografia riguardante l'utilizzo di batterie di saggi per la caratterizzazione ecotossicologica dei rifiuti è stata effettuata prevalentemente con il motore di ricerca PubMed e attraverso la consultazione di periodici scientifici specializzati.

L'indagine ha messo in evidenza che le applicazioni di batterie di saggi per le differenti tipologie di rifiuto sono, a tutt'oggi, ancora piuttosto limitate. Pertanto, dall'analisi di circa 50 pubblicazioni individuate si è ritenuto di selezionare, sulla base della completezza dei risultati presentati, 23 lavori scientifici pubblicati nel periodo compreso tra il 1997 e il 2011.

I singoli contributi sono presentati in maniera sintetica attraverso schede che descrivono gli elementi ritenuti rilevanti per gli obiettivi del nostro lavoro e di seguito elencati:

1. Riferimento bibliografico (autori, titolo, pubblicazione)
2. Tipologie di rifiuto indagate
3. Scopo dello studio
4. Criteri di selezione della batteria di test ecotossicologici
5. Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità
6. Caratterizzazione fisico-chimica dei rifiuti (parametri analizzati)
7. Test ecotossicologici (organismo/tipo di test, parametri misurati/metodo di riferimento, espressione dei risultati)
8. Conclusioni

Le schede dei lavori selezionati sono riportate di seguito in ordine cronologico. Al fine di identificare con maggior precisione le diverse tipologie di rifiuto caratterizzate mediante batteria, viene riportato il codice dell'Elenco Europeo dei Rifiuti che, se non indicato dagli Autori, è stato, quando possibile, attribuito per deduzione.

Bernard C., Janssen Colin R. and Le Du-Delepierre A.  
**Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates**  
*Chemosphere Vol. 35, No. 11 (1997) 2783-2796*

Rifiuti	N° campioni	Codice EER
Percolato da discarica	22	190702*/03

<b>Scopo</b>	Verificare la correlazione tra parametri chimico-fisici ed ecotossicologici nel valutare la tossicità di campioni di percolato da discarica, attraverso l'analisi di regressione e l'Analisi delle Componenti Principali (PCA, Principal Component Analysis).
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	N.a.
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	N.a.

#### Caratterizzazione fisico-chimica

<b>Parametri analizzati</b>	pH e conducibilità
	Alcalinità
	COD
	N organico
	NH <sub>3</sub>
	Metalli pesanti
	Solfati
Cl, Ca, Mg	

#### Test ecotossicologici

##### Rifiuto liquido

Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Protozoi - <i>Spirostomum ambiguum</i>/acuto (24h)</b>	Inibizione della crescita/microbiotest (Toxkit)	LC <sub>50</sub> convertite in UT <sup>1</sup>
<b>Batteri bioluminescenti - <i>Vibrio fischeri</i>/acuto (30min)</b>	Inibizione luminescenza /AFNOR NF T90-320 (AFNOR, 1991)	EC <sub>50</sub> convertite in UT
<b>Rotiferi - <i>Brachionus calyciflorus</i>/cronico (24-48h)</b>	Mortalità e inibizione della riproduzione /microbiotest (Toxkit)	LC <sub>50</sub> convertite in UT
<b>Crostacei Cladoceri - <i>Daphnia magna</i>/acuto</b>	Inibizione mobilità /AFNOR NF T 90-301 (AFNOR, 1990b) microbiotest (Toxkit)	EC <sub>50</sub> convertite in UT
<b>Crostacei Cladoceri - <i>Ceriodaphnia dubia</i>/acuto (24h)</b>	Mortalità/microbiotest (Toxkit)	LC <sub>50</sub> convertite in UT
<b>Crostacei Anostraci - <i>Thamnocephalus platyurus</i>/acuto (24-48h)</b>	Mortalità /microbiotest (Toxkit)	LC <sub>50</sub> convertite in UT
<b>Alghie - <i>Scenedesmus subspicatus</i>/cronico</b>	Inibizione della crescita/ AFNOR NT 90-304	EC <sub>50</sub> convertite in UT
<b>Piante vascolari acquatiche - <i>Lemna minor</i>/cronico (5gg)</b>	Inibizione della crescita	EC <sub>50</sub> convertite in UT

#### Conclusioni

La risposta degli organismi testati è stata variabile, ma tutti hanno evidenziato l'ecotossicità dei campioni di rifiuto analizzati. Sulla base delle misure effettuate, non è stato possibile identificare la caratteristica chimico-fisica che contribuisce maggiormente all'ecotossicità del rifiuto. Tuttavia l'analisi di PCA ha messo in evidenza che l'alcalinità, la conduttività, la concentrazione di ammonio e di azoto organico possono rappresentare indicatori di potenziale tossicità. In particolare, la tossicità dell'ammonio nel percolato di discarica era stata evidenziata precedentemente anche da altri Autori (Clement et al., 1993; Clement and Merlin, 1995). I livelli di ammonio insieme all'alcalinità son risultati responsabili della tossicità per la maggior parte degli organismi utilizzati, ad eccezione del batterio *V. fischeri* che è risultato maggiormente sensibile alla componente organica del percolato. Si conferma che per una valutazione esaustiva dei risultati è necessario combinare l'approccio fisico-chimico con quello ecotossicologico.

<sup>1</sup> UT: Unità Tossiche 1/E(L)C<sub>50</sub> (Sprague & Ramsay, 1965)

Rojičková-Padrťová R., Maršálek B., Holoubek I.

**Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: selection of an optimal test battery**

*Chemosphere, Vol. 37, No. 3 (1998) 495-507*

Rifiuti	N° campioni	Codice EER
Fanghi da trattamento acque urbane e da sedimentazione di acque di origine industriale	5	190811*/12/13*/14
Ceneri leggere da combustione in impianti energetici	1	1001XX*/XX <sup>1</sup>
Polveri di fonderia	1	10XXXX <sup>1</sup>

<b>Scopo</b>	- Valutare la sensibilità dei saggi ecotossicologici impiegati - Dimostrare la comparabilità dei risultati di una batteria composta da sei Microbiotest rispetto alla batteria standard tradizionalmente utilizzata a livello nazionale costituita da 3 organismi (alga, crostaceo, pesce)
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	- Organismi rappresentativi di differenti livelli trofici e differenti sensibilità - Semplicità di esecuzione dei saggi
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	N.a.

**Caratterizzazione fisico-chimica**

<b>Parametri analizzati</b>	N.a.
-----------------------------	------

**Test ecotossicologici**

**Lisciviato**

Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Batteria standard utilizzata a livello nazionale</b>		
<b>Alghe - <i>Raphidocelis subcapitata</i>/cronico (96h)</b>	Inibizione della crescita /ISO 8692	EC <sub>50</sub> convertite in UT <sup>2</sup>
<b>Crostacei cladoceri - <i>Daphnia magna</i>/acuto (48h)</b>	Inibizione mobilità/ISO 6341	EC <sub>50</sub> convertite in UT
<b>Pesci - <i>Poecilia reticulata</i>/acuto (48h)</b>	Mortalità/ISO 7346	LC <sub>50</sub> convertite in UT
<b>Batteria di Microbiotest</b>		
<b>Batteri bioluminescenti - <i>Vibrio fischeri</i> / acuto (15min)</b>	Inibizione bioluminescenza/secondo Bulich (1979)	EC <sub>50</sub> convertite in UT
<b>Alghe - <i>Raphidocelis subcapitata</i>/cronico (96h)</b>	Algal Microplate assay secondo Blaise 1986 e Lukavsky 1992 (metodo su piastra)	
<b>Protozoi - <i>Spirostomum ambiguum</i>/acuto (24h)</b>	Mortalità/Toxkit (Le Du Delepierre et al., 1996)	LC <sub>50</sub> convertite in UT
<b>Rotiferi - <i>Brachionus calyciflorus</i>/acuto (24h)</b>	Mortalità/Toxkit (Snell et al., 1995)	LC <sub>50</sub> convertite in UT
<b>Crostacei anostraci - <i>Thamnocephalus platyurus</i>/acuto (24h)</b>	Mortalità/Toxkit (Centeno et al., 1995)	LC <sub>50</sub> convertite in UT
<b>Crostacei cladoceri - <i>Ceriodaphnia dubia</i>/acuto (24h)</b>	Mortalità/Toxkit	LC <sub>50</sub> convertite in UT

**Conclusioni**

La sensibilità della batteria di sei microbiotest è risultata comparabile a quella costituita da 3 saggi con alga, crostaceo, e pesce.

Gli organismi più sensibili identificati nello studio sono: l'Alga *R. subcapitata*, il crostaceo *C. dubia* e il protozoo *S. ambiguum*. In particolare, i saggi con i crostacei *T. platyurus*, *D. magna* e il rotifero *B. calyciflorus* hanno presentato lo stesso potenziale di valutazione della tossicità e una sensibilità comparabile. Il saggio acuto con la specie ittica *Poecilia reticulata* è, al contrario risultato il meno sensibile.

Comparando le diverse sensibilità dei saggi utilizzati, gli Autori hanno identificato, una batteria composta da: 1) saggio algale in micropiastra con *R. subcapitata*; 2) microbiotest con rotiferi o con il crostaceo *T. platyurus*; 3) microbiotest con il batterio *V. fischeri* e/o microbiotest con il protozoo *S. ambiguum*

<sup>1</sup>Dalla descrizione del rifiuto non è possibile identificare più specificamente la tipologia; esso rimane quindi definito solo come macrocategoria;

<sup>2</sup> UT: Unità Tossiche 1/E(L)C<sub>50</sub> (Sprague & Ramsay, 1965)

Ferrari B., Radetski M.C., Veber AM. And Ferard JF.

**Ecotoxicological assessment of solid wastes: a combined liquid- and solid-phase testing approach using a battery of bioassays and biomarkers**

*Environmental toxicology and Chemistry Vol. 18, No. 6 (1999) 1195-1202*

Rifiuti	N° campioni	Codice EER
Ceneri pesanti (contenenti sostanze pericolose e non) da incenerimento di rifiuti	6	190111*/12

<b>Scopo</b>	Comparare i risultati dei test ecotossicologici applicati su rifiuto solido (test diretti) con quelli applicati su lisciviato (test indiretti) attraverso l'utilizzo di una batteria.
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	- Organismi rappresentativi di differenti livelli trofici. - Semplicità di esecuzione. - Economicità dei test - <i>Endpoint</i> differenti
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	N.a.

Caratterizzazione fisico-chimica	Matrice solida	Lisciviato
Parametri analizzati	Cd, Pb, Cu, Fe	pH Cd, Pb, Cu, Fe

Test ecotossicologici		
Rifiuto solido		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Piante vascolari superiori, (monocotiledoni e dicotiledoni) - <i>Avena sativa</i>, <i>Brassica campestris var chinensis</i> e <i>Lactuca sativa</i> / subcronico (10gg)</b>	Inibizione germinazione, inibizione della crescita e stress, attività enzimatica (superossido dismutasi, perossidasi, catalasi, glutazione reductasi) /OECD LG 208	LOEC convertito in UT <sup>1</sup>
Lisciviato <sup>(3)</sup>		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Batteri bioluminescenti - <i>Vibrio fischeri</i> /acuto (15, 30 e 60min)</b>	Inibizione bioluminescenza metodo secondo Blaise et al., 1994	EC <sub>50</sub> convertito in UT
<b>Crostacei cladoceri - <i>Daphnia magna</i> /cronico (21gg)</b>	Inibizione crescita e riproduzione/metodo secondo Ferrari 1996	EC <sub>50</sub> convertito in UT
<b>Crostacei cladoceri - <i>Ceriodaphnia dubia</i> /cronico (7gg)</b>	Inibizione crescita e riproduzione /metodo secondo Ferrari and Ferard, 1996	EC <sub>50</sub> convertito in UT
<b>Alghe - <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> /cronico (72h)</b>	Inibizione crescita/metodo secondo Radetsky et al., 1995	EC <sub>50</sub> convertito in UT
<b>Piante vascolari superiori, (monocotiledoni e dicotiledoni) - <i>Avena sativa</i>, <i>Brassica campestris var chinensis</i> e <i>Lactuca sativa</i> / subcronico (10gg)</b>	Inibizione germinazione, inibizione della crescita e stress, attività enzimatica (superossido dismutasi, perossidasi, catalasi, glutazione reductasi)/OECD LG 208	LOEC convertito in UT

Conclusioni
<p>Per i saggi indiretti su lisciviato, la scala di sensibilità degli organismi utilizzati è, in ordine decrescente, la seguente: <u>alga ≈ biomarker enzimatici piante &gt; <i>C. dubia</i> &gt; <i>V. fischeri</i> &gt; test di crescita piante ≈ test di germinazione ≈ <i>D. magna</i>.</u></p> <p>Il test cronico con la specie <i>C. dubia</i> è risultato più idoneo rispetto a quello con <i>D. magna</i>.</p> <p>Per i saggi diretti su solido, la scala di sensibilità degli organismi utilizzati è, in ordine decrescente, la seguente: <u>biomarker enzimatici piante &gt; test crescita piante ≈ test germinazione.</u></p> <p>A fronte di una maggiore sensibilità dei biomarker enzimatici sulle piante si sottolinea il costo elevato di questo saggio rispetto a tutti gli altri.</p> <p>Il test su matrice solida appare più sensibile, tuttavia il test su lisciviato è più consolidato e si hanno a disposizione maggiori dati in letteratura. Pertanto, la combinazione di test diretti e indiretti risulta necessaria per una più precisa valutazione dell'ecotossicità.</p>

<sup>1</sup>UT: Unità Tossiche 1/E(L)C<sub>50</sub> (Sprague & Ramsay, 1965)

Maxam G., Rila JP, Dott W. and Eisentraeger A.  
**Use of bioassays for assesment of water-extractable ecotoxic potential of soils**  
*Ecotoxicology and Environmental Safety* **45** (2000) 240-246

Rifiuti	N° campioni	Codice EER
Suolo contaminato	6	170503*/04

<b>Scopo</b>	Valutare il potenziale rischio ecotossicologico di suoli contaminati in relazione alla biodisponibilità dei differenti inquinanti, in funzione della destinazione d'uso dei suoli. Valutare le caratteristiche dei suoli attraverso saggi ecotossicologici e analisi chimico-fisiche, in particolare: a) La capacità di ritenzione dei suoli (mobilità degli inquinanti nel suolo attraverso la fase acquosa) b) La funzione biologica dei suoli attraverso l'indice di respirazione e di nitrificazione c) La sopravvivenza e la crescita delle piante
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	- Organismi rappresentativi di differenti livelli trofici - Tipologia di rifiuto e di contaminazione
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	N.a.

Caratterizzazione fisico-chimica	Matrice solida e lisciviato
<b>Parametri analizzati</b>	pH,
	IPA
	VOC
	BTEX
	Composti aromatici azotati, Ar, Cd, Cu, Pb, Hg, Ni, Zn
IPA: Idrocarburi Policiclici Aromatici; VOC: Composti Organici Volatili; BTEX: Petroleum-derived compounds (Benzene, toluene, etilbenzene e xilene)	

Test ecotossicologici		
Lisciviato		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Batteri bioluminescenti</b> - <i>Vibrio fischeri</i> /acuto	Inibizione della crescita e della bioluminescenza/ DIN 38412-34- L37	G20% <sup>1</sup>
<b>Batteri</b> - <i>Pseudomonas putida</i> /cronico	Inibizione della crescita /DIN 38412- L8	G20%
<b>Crostacei cladoceri</b> - <i>Daphnia magna</i> /acuto	Inibizione mobilità /DIN 38412- L11 e L30	G10%
<b>Alghe</b> - <i>Scenedesmus subspicatus</i> /cronico	Inibizione della crescita /DIN 38412- L33	G20%

Conclusioni
<p>La caratterizzazione chimico-fisica e quella ecotossicologica sono entrambe necessarie per arrivare a definire il potenziale ecotossico di un suolo contaminato.</p> <p>Per valutare l'ecotossicità dei diversi lisciviati sono stati utilizzati i valori soglia proposti da Dott et al., 1995 (Alghe e <i>D. magna</i> G value &gt;4; <i>V. fischeri</i> G value &gt; 2; <i>P. putida</i> G value &gt; 8). Il superamento del valore soglia da parte di un solo organismo della batteria indica presenza di rischio ecotossicologico (ipotesi cautelativa), mentre il mancato superamento dei valori soglia da parte di tutti gli organismi della batteria è indice di "non effetto". Sulla base di questa scala dicotomica, gli Autori stabiliscono la tossicità di 4/6 campioni di suolo contaminato analizzati. Tuttavia essi sottolineano l'importanza della definizione di una scala di tossicità più ampia per poter meglio identificare il "grado" di rischio potenziale; infatti, una classificazione basata esclusivamente sul dualismo tossico/non tossico, non è in grado di esprimere correttamente il reale potenziale inquinante.</p> <p>La preparazione del lisciviato costituisce una fase critica e di fondamentale importanza per la buona riuscita e la rappresentatività dei risultati dei saggi ecotossicologici.</p>

<sup>1</sup> Fattore G; minimo fattore di diluizione che determina un effetto inferiore al 10% o 20%. Il fattore G corrisponde al LID (Lowest Ineffective Dilution)

Juvonen R., Martikainen E., Schultz E., Joutti A., Ahtiainen J. and Lehtokari M.  
**A battery of toxicity tests as indicators of decontamination in composting oily waste**  
*Ecotoxicology and Environmental Safety* 47 (2000) 156-166

Rifiuti	N° campioni	Cod EER
Rifiuti oleosi eterogenei da raffineria di petrolio	5	05 <sup>1</sup>

<b>Scopo</b>	- Caratterizzazione dei rifiuti mediante una batteria di saggi ecotossicologici. - Selezione della batteria migliore, caratterizzata da elevata fattibilità e basso costo, da impiegare per la valutazione della decontaminazione dei suoli contenenti residui di rifiuti oleosi durante il loro compostaggio.
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	- Organismi rappresentativi di differenti livelli trofici - Utilizzo di differenti <i>endpoint</i> e sistemi di saggio ( <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> e <i>microbiotest</i> )
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	N.a.

#### Caratterizzazione fisico-chimica

<b>Parametri analizzati</b>	pH
	Umidità
	ATP
	Benzene, toluene e IPA,
	Metalli pesanti (As, Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, Zn, e V)
	Idrocarburi petroliferi totali

#### Test ecotossicologici

Rifiuto solido		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Metodo di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Batteri bioluminescenti</b> - <i>Vibrio fischeri</i> /test di contatto diretto (5-15 min)	Inibizione della luminescenza/ Brouwer et al., 1990 modificato	EC <sub>20</sub> EC <sub>50</sub>
<b>Piante vascolari terrestri</b> - <i>Trifolium pratense</i> /(4-7 gg)	Inibizione di crescita/Wang, 1991	Percentuale di inibizione
<b>Collemboli</b> - <i>Folsomia candida</i> /acuto e subcronico (14 e 32 gg)	Mortalità degli adulti e numero di giovanili/ISO FDIS 11267 modificata	% di mortalità
<b>Anellidi oligocheti</b> - <i>Enchytraeus albidus</i> , <i>Enchytraeus sp</i> /acuto e subcronico (14 e 32 gg)	Mortalità degli adulti e numero di giovanili/ ISO WD 16387 modificata	% di mortalità
Lisciviato		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Metodo di riferimento	Espressione dei risultati
Particelle submitocondriali isolate dai mitocondri di cuore di bovino/ Reverse Electron Transport (RET) assay/ acuto (20 minuti)	Riduzione del NAD* a NADH /Knobeloch et al., 1994; Argese et al., 1995; Read et al., 1998	Percentuale di inibizione
<b>Batteri luminescenti</b> - <i>Vibrio fischeri</i> /acuto (5, 15 e 30 min)	Inibizione della bioluminescenza/ISO/CD 11348-3	Percentuale di inibizione
<b>Batteri</b> - <i>Pseudomonas putida</i> /cronico (16 h)	Inibizione della crescita/ISO 10712	Percentuale di inibizione
<b>Batteri</b> - ceppo mutante di <i>Escherichia coli</i> /ToxiChromo test (test colorimetrico)	Inibizione della sintesi <i>de novo</i> della $\beta$ galattosidasi	Percentuale di inibizione
<b>Batteri</b> - ceppo mutante di <i>Escherichia coli</i> /MetPLATE assay specifico per la tossicità dei metalli pesanti	Inibizione dell'attività dell'enzima $\beta$ galattosidasi/ Bitton et al., 1992	Percentuale di inibizione
<b>Batteri</b> - ceppo mutato di <i>Vibrio fischeri</i> /Mutatox genotoxicity assay	Reversione della mutazione espressa dal ripristino dell'emissione di luminescenza/Microbics Corp. Carlsbad, CA	Genotossicità relativa percentuale
<b>Piante vascolari acquatiche</b> - <i>Lemna minor</i> /cronico (3-5 gg)	Numero delle fronde, peso fresco e contenuto di clorofilla/OECD n° 221	IC <sub>50</sub>

---

## Conclusioni

I risultati ottenuti con i saggi di tossicità effettuati sui suoli contaminati sottoposti a compostaggio (i test sono stati ripetuti a tempi diversi durante un periodo di 4 mesi) mostrano una diminuzione progressiva della tossicità particolarmente evidente negli ultimi stadi del processo stesso. Questo fenomeno deriva sia dalla degradazione microbica che provoca la riduzione delle concentrazioni di idrocarburi oleosi e sia dalla progressiva stabilizzazione del compost a causa della quale diminuisce la biodisponibilità dei residui oleosi.

I saggi ecotossicologici utilizzati presentano una differente sensibilità alla degradazione degli idrocarburi nei 3 stadi del processo di compostaggio: [a) 1° mese: scompaiono le sostanze volatili; b) 2°-3° mese: degradazione progressiva e continua di tutti i gruppi di idrocarburi oleosi; c) 4° mese: la proporzione delle frazioni oleose estremamente pesanti diviene preponderante e ha luogo la stabilizzazione del compost]

La batteria minima selezionata è composta dai saggi ecotossicologici risultati più sensibili, la cui tossicità inoltre correla con la riduzione della concentrazione di idrocarburi oleosi, che sono: RET assay > Batteri *Vibrio fischeri* su lisciviato > Batteri *Vibrio fischeri* test di contatto diretto > Piante *Trifolium pratense* > Collemboli *Folsomia candida* > Anellidi *Enchytraeus sp*. Questa batteria è costituita da organismi di differenti livelli trofici capaci di effettuare valutazioni sia sulla matrice solida che su lisciviato.

<sup>1</sup>Poichè manca l'indicazione degli autori, in funzione dell'origine dei rifiuti viene attribuita la macrocategoria 05

Schultz E., Vaajasaari K., Joutti A. and Ahtiainen J.

**Toxicity of industrial wastes and waste leachin test eluates containing organic compounds**

*Ecotoxicology and Environmental Safety* **52** (2002) 248-255

Rifiuti	N° campioni	Codice EER
Fanghi acquosi contenenti pitture e vernici (contenenti solventi organici o altre sostanze pericolose)	1	08 01 15*
Olio di resina (produzione di resine di urea-formaldeide, contenenti formaldeide, metanolo e urea)	1	08 04 17*

<b>Scopo</b>	Valutazione dell'applicabilità di differenti procedure di lisciviazione (CEN PrEN 12457-2, CEN PrEN 12457-3 e NEN 7349) per i rifiuti di origine industriale contenenti composti organici pericolosi. La tossicità dei vari lisciviati è valutata mediante una batteria di saggi <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	Affiancare al saggio semplice, rapido, consolidato e ad elevata sensibilità con Batteri bioluminescenti, un saggio con una specie, ecologicamente rilevante, ma, secondo gli Autori, di minore sensibilità (piante) e due test <i>in vitro</i> .
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	1) Toxicity Classification System (TCS): Lapa et al., 2002 modificato da Persoone, et al., 2003 (vedi tabella 5 del presente rapporto) 2) Hazardous Concentrations (HC <sub>5</sub> ): calcolata con il programma ETX- 2.0 (Van Vlaardingen et al., 2004). HC <sub>5</sub> è la concentrazione pericolosa calcolata, assumendo che a tale concentrazione di rifiuto non più del 5% di tutte le specie e processi microbici utilizzati, mostrano un effetto dannoso pari al 50% (se si utilizzano i valori di EC <sub>50</sub> ) o una percentuale non significativamente differente dal controllo (se si utilizzano i valori di NOEC).

Caratterizzazione fisico-chimica		
	Matrice solida	Lisciviato
Parametri analizzati	Solventi organici	pH
	TOC	Solventi organici
		Formaldeide e urea
		TOC

Test ecotossicologici		
Rifiuto solido		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Metodo di riferimento	Espressione dei risultati
Piante vascolari terrestri - <i>Lactuca sativa</i> /acuto (5 gg)	Percentuale di semi germinati/modifica del metodo US EPA 600/3-88-029	
Lisciviato		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Metodo di riferimento	Espressione dei risultati
Particelle submitocondriali isolate dai mitocondri di cuore di bovino/ Reverse Electron Transport (RET) assay	Riduzione del NAD* a NADH /Knobeloch et al., 1994; Argese et al., 1995; Read et al., 1998	EC <sub>50</sub>
Batteri luminescenti - <i>Vibrio fischeri</i> /acuto (30 min)	Inibizione della bioluminescenza/EN ISO 11348 - 3	EC <sub>50</sub>
Batteri - ceppo mutante di <i>Escherichia coli</i> /ToxiChromopad kit assay	Inibizione della sintesi <i>de novo</i> della β-galattosidasi	EC <sub>50</sub>
Piante vascolari superiori - <i>Allium cepa</i> /acuto (4 gg)	Crescita dell'apparato radicale/De Mariani, 1991; Fiskeesjö 1997, Kristen, 1997	EC <sub>50</sub>

Conclusioni
I metodi di lisciviazione acquosa sono risultati sufficientemente efficaci e migliori di quelli che utilizzano estrattori organici, nel lisciviare i solventi organici dai rifiuti analizzati I saggi proposti nella batteria sono risultati idonei a valutare l'ecotossicità dei rifiuti pericolosi studiati secondo la seguente scala di sensibilità: batteri bioluminescenti > RET assay > Piante <i>Allium cepa</i> > ToxiChromopad assay.



Lapa N., Barbosa R., Morai J., Mendes B., Méhu J., Santos Oliveira J.F.  
**Ecotoxicological assesement of leachates from MSWI bottom ashes**  
*Waste Management* 22 (2002) 583-593

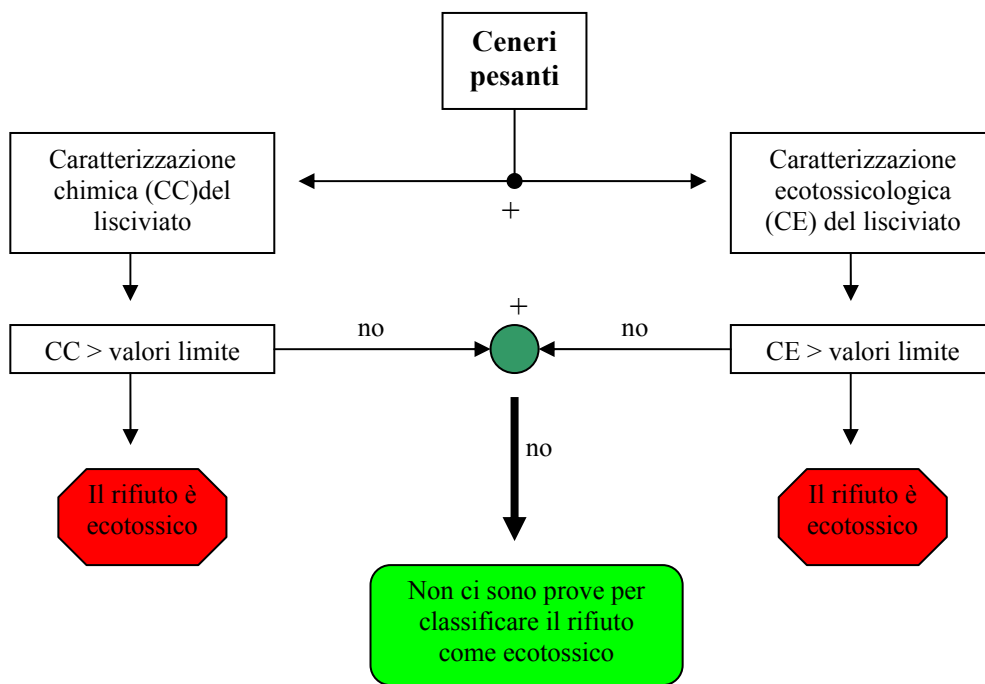
Rifiuti	N° campioni	Codice EER
Ceneri pesanti (contenenti sostanze pericolose e non) da incenerimento di rifiuti	7	19 01 11*/12

<b>Scopo</b>	- Valutare l'applicazione della metodologia del Ministero Francese dell'Ambiente (CEMWE, Criterion and Evaluation Methods of Waste Ecotoxicity. French Ministry of Environment/Directorate for Prevention Pollution and Risk Control, 1998, "Criteria and methods for the assesement of the ecotoxicity of wastes") (vedi figura 4) e del Regolamento tedesco per la Classificazione dei Rifiuti Pericolosi alle ceneri e scorie pesanti provenienti da impianti di incenerimento. - Valutare la tossicità delle ceneri utilizzando il metodo francese CBAPP (French Classification of Bottom Ashes based on their Polluting Potential) e il TSC (Toxicity Classification System) proposto da Persoone et al., 2003.
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	- Organismi rappresentativi di differenti livelli trofici. - Uso di metodi armonizzati e/o convalidati a livello europeo e/o internazionale
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	TSC (Persoone et al., 2003) (vedi capitolo 3 del presente lavoro) e modificato (vengono stabilite 4 classi di ecotossicità)

Caratterizzazione fisico-chimica	Matrice solida
<b>Parametri analizzati</b>	pH
	TOC
	Al, As, Cd, Cr e CrVI, Cu, Fe, Pb, Ni, Zn
	NH <sub>4</sub>
	Cloruri e Fluoruri
	Conducibilità
	Nitriti e Solfati
Indice fenolo	

Test ecotossicologici		
Rifiuto solido		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Piante vascolari terrestri - <i>Lactuca sativa</i> /acuto (7gg)</b>	Inibizione della germinazione / AFNOR X31-201	EC <sub>50</sub>
Lisciviato		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Batteri bioluminescenti - <i>Photobacterium phosphoreum</i> / acuto (15-30min)</b>	Inibizione bioluminescenza /ASTM D-5660 e ISO 11348-3	EC <sub>50</sub>
<b>Alghe - <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>/cronico (5gg)</b>	Inibizione della crescita /ISO 8692	EC <sub>20</sub> EC <sub>50</sub>
<b>Crostacei cladoceri - <i>Daphnia magna</i> /acuto (48h)</b>	Inibizione della mobilità /ISO 6341	EC <sub>50</sub>

Conclusioni
La caratterizzazione chimica delle ceneri pesanti analizzate ha mostrato un'elevata variabilità nei diversi campioni. Entrambi gli approcci, francese e tedesco (vedi figura 4) utilizzati per la caratterizzazione, hanno portato ad una classificazione delle ceneri pesanti, sovrapponibile. Tuttavia, i risultati riguardanti la classificazione finale di tossicità delle ceneri analizzate applicando i due sistemi CBAPP e TSC (Persoone et al., 2003) appaiono contrastanti e non coerenti tra loro. A tale proposito, gli Autori sottolineano che le differenti metodologie di classificazione della tossicità adottate a livello comunitario, necessitano di un processo di armonizzazione soprattutto nella prospettiva del recupero e riutilizzo dei rifiuti.



**Figura 4** – Metodologia utilizzata per valutare l’ecotossicità delle ceneri pesanti. Modificato da figura 1 di Lapa et al., 2002. Rispetto ai criteri francesi in base ai quali il rifiuto può essere caratterizzato o mediante analisi chimica o mediante saggi ecotossicologici, la metodologia applicata nel presente lavoro considera i due approcci, chimico ed ecotossicologico, allo stesso livello di importanza. Vedi per confronto Ferrari and Ferard, 2005.

Isidori M., Lavorgna M., Nardelli A., Parrella A.

**Toxicity identification evaluation of leachates from municipal solid waste landfills: a multispecies approach**  
*Chemosphere* **52** (2003) 85-94

Rifiuti	N° campioni	Codice EER
Percolato di discarica	3	190702*/03

<b>Scopo</b>	Identificare i componenti maggiormente responsabili della tossicità del percolato attraverso l'applicazione della prima fase del TIE (Toxicity Identification Evaluation) <sup>1</sup> associata ad una batteria di saggi ecotossicologici.
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	- Organismi rappresentativi di differenti livelli trofici. - Sensibilità specifica degli organismi. - Riproducibilità e rapidità di risposta dei test.
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	N.a.

#### Caratterizzazione fisico-chimica

<b>Parametri analizzati</b>	pH
	COD, BOD, BOD/COD
	Oli minerali
	N-ammoniacale
	Hg, Cu, Ni, Zn, V, Al, Pb, Crtot, Cd
	Fenoli totali
	Toluene, Benzene, o,m,p-Xilene
	Tricloroetilene, Tetracloroetilene, 1-1-1-Tricloroetano, Tetraclorometano Cloroformio

#### Test ecotossicologici

##### Rifiuto liquido

Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Batteri bioluminescenti</b> - <i>Vibrio fischeri</i> /acuto (5, 15 e 30min)	Inibizione bioluminescenza /microbiotest Microtox	EC <sub>50</sub> convertito in UT <sup>2</sup>
<b>Rotiferi</b> - <i>Brachionus calyciflorus</i> /acuto (24h)	Mortalità/microbiotest Rotoxkit F <sup>TM</sup> (Creasel, 1992)	LC <sub>50</sub> convertito in UT
<b>Crostacei Anostraci</b> - <i>Thamnocephalus platyurus</i> /acuto (24h)	Mortalità/microbiotest Thamnotoxkit F <sup>TM</sup> (Creasel, 1995)	LC <sub>50</sub> convertito in UT
<b>Crostacei Cladoceri</b> - <i>Daphnia magna</i> /acuto (24-48h)	Immobilizzazione/microbiotest Daphtoxkit F <sup>TM</sup> (Creasel, 1996)	EC <sub>50</sub> convertito in UT

#### Conclusioni

La fase I del TIE approach consente di identificare la natura fisica e chimica dei composti che causano tossicità acuta. Nel caso del percolato la metodica ha consentito di discriminare sufficientemente i differenti componenti inquinanti, costituiti da cationi metallici divalenti, composti apolari, solidi sospesi e composti basici solubili come lo ione ammonio. Questi sono i principali parametri che determinano la tossicità del percolato. La tossicità del percolato è stata valutata mediante quattro Microbiotest: tra di essi *T. platyurus* è risultata la specie più sensibile mentre *V. fischeri* la meno sensibile. A termine della sperimentazione gli Autori hanno individuato una batteria minima composta dal crostaceo *T. platyurus* e dal rotifero *B. calyciflorus* che hanno mostrato maggiore sensibilità. Il test con *V. fischeri* non si è dimostrato affidabile data la notevole influenza dei parametri fisico-chimici sulla risposta dell'organismo.

<sup>1</sup>Toxicity Identification Evaluation approach (TIE) sviluppato da EPA: metodo per l'identificazione delle sostanze tossiche. Esso combina tecniche analitiche chimico-fisiche con i saggi ecotossicologici. La metodologia TIE consta di 3 fasi. La fase 1 è la caratterizzazione del composto tossico (Norberg-King et al., 1991); la fase 2 è l'identificazione del composto tossico (Durhan et al., 1993) e la fase 3 è la fase di conferma di tossicità (Mount, 1989). Nel presente lavoro è stata applicata solo la fase 1, quindi i saggi sono stati effettuati sul lisciviato di percolato senza correzione del pH (baseline test), dopo correzione del pH, dopo filtrazione, con il metodo C18 di estrazione in fase solida e con chelazione mediante EDTA.

<sup>2</sup> UT: Unità Tossiche 1/E(L)C<sub>50</sub> (Sprague & Ramsay, 1965)

Manusadzianas L., Balkelyté L., Sadauskas K., Blinova I., Pöllumaa L., Kahru A.

**Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters: selection of the biotests and correspondence between toxicity and chemical-based indices.**

*Aquatic Toxicology* **63** (2003) 27-41

Rifiuti	N° campioni	Codice EER
Effluenti industriali e lisciviati	13	n.a.
Effluenti degli impianti di trattamento delle acque di scarico	8	n.a.

<b>Scopo</b>	- Applicazione di una serie di <i>microbiotest</i> per la selezione di una batteria minima idonea allo screening degli effluenti di origine urbana e industriale - Studio della correlazione tra alcuni indici di tossicità basati sulle risposte ecotossicologiche e gli indici chimici cumulativi ottenuti comparando i dati chimici con i valori della MAC (Maximum Allowable Concentration) dei contaminanti più importanti.
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	Test rappresentativi di differenti livelli trofici, rapidi e di facile esecuzione (microbiotest)
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	La batteria è valutata utilizzando 4 diversi indici di tossicità: 1) Indice di tossicità media (AvTx) dato dalla somma dei valori degli <i>endpoint</i> espressi in UT diviso il n° dei test; 2) Indice di impronta tossica (TxPr) ottenuto moltiplicando il valore di AvTx per il n° di test che presentano una risposta positiva; 3) Indice PEEP (Costan et al., 1993, vedi tabella 5) secondo la formula $PEEP = \log_{10} [1 + (TxPr)]$ ; 4) Indice MST (Most Sensitive Test) che si basa sul più alto valore di UT ottenuto dai vari test (ipotesi conservativa).

**Caratterizzazione fisico-chimica**

<b>Parametri analizzati</b>	pH
	COD e BOD
	Ammonio
	Fosforo e azoto totale
	Metalli pesanti

**Test ecotossicologici**

Rifiuto liquido		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Metodo di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Batteri luminescenti</b> - <i>Vibrio fischeri</i> /acuto (5, 15 e 30 min)	Inibizione della bioluminescenza/Kahru et al., 1996	EC <sub>50</sub> convertita in UT <sup>1</sup>
<b>Protozoi</b> - <i>Tetrahymena thermophila</i> /acuto (24 h)	Inibizione della crescita/Protoxkit F <sup>TM</sup> (1998)	EC <sub>50</sub> convertita in UT
<b>Crostacei cladoceri</b> - <i>Daphnia magna</i> /acuto (24-48 h)	Mortalità-Immobilizzazione/DaphToxkit F <sup>TM</sup> magna (1996)	LC <sub>50</sub> convertita in UT
<b>Crostacei anostraci</b> - <i>Thamnocephalus platyurus</i> /acuto (24-48 h)	Mortalità / Thamnotoxkit F <sup>TM</sup> (1995)	LC <sub>50</sub> convertita in UT
<b>Alghe</b> - <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> /cronico (72 h)	Inibizione della crescita/ AlgalToxkit F <sup>TM</sup> (1996)	EC <sub>50</sub> convertita in UT
<b>Alghe</b> - <i>Nitellopsis obtusa</i> /acuto (45min)	Potenziale transmembrana a riposo /Charatox (Manusadzianas et al., 1995, 1999)	EC <sub>50</sub> convertita in UT

**Conclusioni**

I diversi saggi sono stati confrontati sia in merito alla loro capacità di rilevare la tossicità (parametro qualitativo; se tossicità ≥ 0,4 UT) che di quantificarla (parametro quantitativo; se tossicità ≥ 1,0 UT). La sensibilità dei diversi biosaggi è risultata la seguente:

Qualitativa: Charatox > Thamnotoxkit > Microtox *V. fischeri* > DaphToxkit > Protoxkit > AlgalToxkit

Quantitativa: Charatox > Thamnotoxkit > Protoxkit > Microtox *V. fischeri* > DaphToxkit > AlgalToxkit

Attraverso l'analisi statistica PCA è definita la batteria minima per lo screening preliminare degli effluenti, costituita da Charatox, Thamnotoxkit e Microtox *V. fischeri*.

La comparazione tra i diversi indici di tossicità e gli indici chimici mette in evidenza che la migliore correlazione tra le valutazioni ecotossicologiche e quelle chimiche si ottiene quando l'informazione non deriva da un solo test (il più sensibile), ma da tutti i test utilizzati nella batteria.

<sup>1</sup> UT: Unità Tossiche 1/E(L)C<sub>50</sub> (Sprague & Ramsay, 1965)

Ferrari B. and Ferard JF.

**Use of a battery of bioassays to classify hazardous wastes and evaluate their impact in the aquatic environment**  
*NEAR Curriculum in Natural Environmental Science, 2005, Terre et Environnement, Vol. 50 (2005) 1–26*

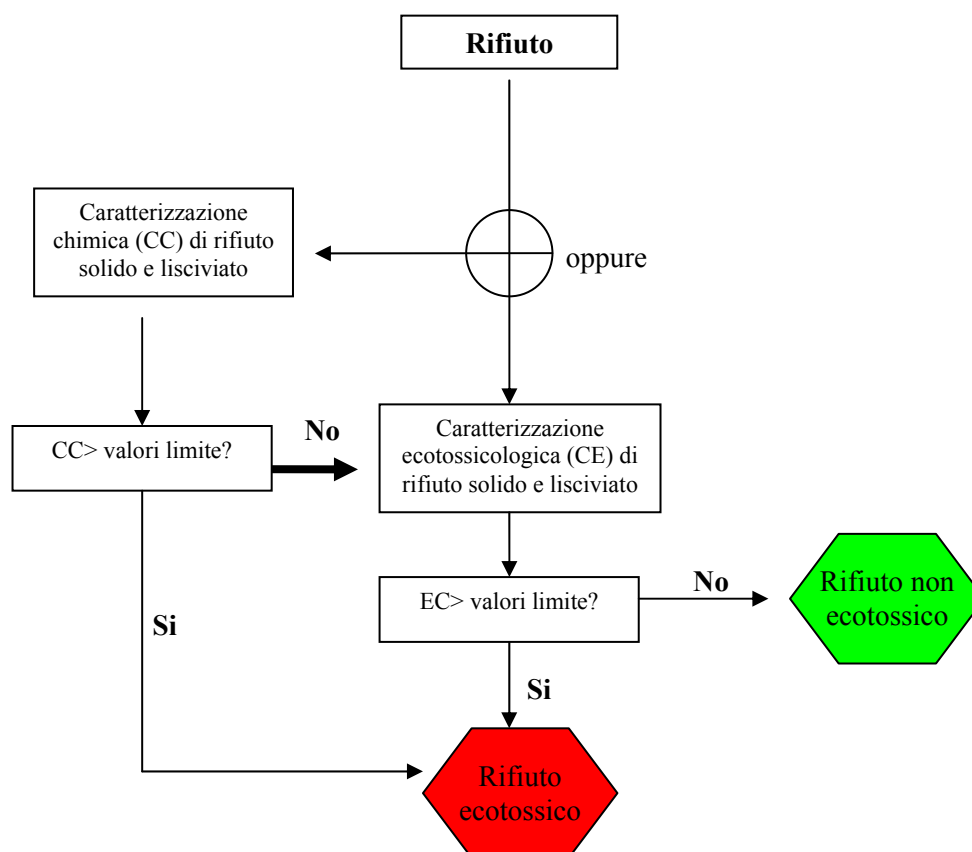
Rifiuti	N° campioni	Codice EER
Ceneri pesanti e scorie contenenti sostanze pericolose da incenerimento di rifiuti	1	190111*
Rifiuti della metallurgia termica del piombo	1	1004XX*

<b>Scopo</b>	Applicazione della metodologia proposta dal Ministero Francese dell’Ambiente per la definizione della caratteristica H14 (French Ministry of Environment/Directorate for Prevention Pollution and Risk Control, 1998, “ <i>Criteria and methods for the assesment of the ecotoxicity of wastes</i> ”) per le ceneri pesanti e le scorie contenenti sostanze pericolose. Vedi figura 5 e tabella 22.
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	N.a.
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	N.a.

<b>Caratterizzazione fisico-chimica</b>	N.a
---	-----

Test ecotossicologici		
Rifiuto solido		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Piante vascolari terrestri - <i>Lactuca sativa</i>/subcronico (14gg)</b>	Inibizione della crescita/OECD LG 208	EC <sub>50</sub>
Lisciviato		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Batteri bioluminescenti - <i>Vibrio fischeri</i>/acuto (30 min)</b>	Inibizione bioluminescenza/AFNOR T90-320-3	EC <sub>50</sub>
<b>Crostacei cladoceri - <i>Daphnia magna</i>/acuto (24-48h)</b>	Inibizione mobilità/AFNOR T90-301	EC <sub>50</sub>
<b>Crostacei cladoceri - <i>Ceriodaphnia dubia</i>/cronico (7gg)</b>	Inibizione della riproduzione e della crescita/ EPA 600/4-91/002	EC <sub>50</sub> EC <sub>20</sub>
<b>Alge - <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>/cronico (72h)</b>	Inibizione della crescita/AFNOR T90-375	EC <sub>50</sub> EC <sub>20</sub>

Conclusioni
L'utilizzazione di test ecotossicologici è fondamentale per definire in modo esaustivo i possibili effetti tossici di un rifiuto. Per le ceneri pesanti la scala di sensibilità dei diversi saggi utilizzati è risultata la seguente: <i>Alge</i> > <i>Daphnia</i> > <i>Vibrio</i> > <i>Ceriodaphnia</i> . Per i fanghi contaminati da Pb: <i>Vibrio</i> > <i>Ceriodaphnia</i> > <i>test algale</i> ≈ <i>Daphnia</i> . I test ecotossicologici dovrebbero essere condotti utilizzando specie che provengono dagli ambienti potenzialmente soggetti all'inquinamento del rifiuto che si intende analizzare.



**Figura 5** – Criteri e metodi per la valutazione di ecotossicità dei rifiuti del Ministero Francese dell’Ambiente nel 1998. Da Ferrari and Ferard, 2005, modificato.

**Tabella 22** – Limiti ecotossicologici definiti nella proposta del Ministero Francese dell’Ambiente (1998)

Tipo di misura	Indicatore biologico	Valore limite <sup>a</sup>
Misura indiretta della tossicità (lisciviato di rifiuto)	Microtox TM – EC50 <sup>b</sup> (30 minuti)	10%
	<i>Daphnia magna</i> – EC50 (48 h)	10%
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> – EC20 (72 h)	0,1%
	<i>Ceriodaphnia dubia</i> – EC20 (7 giorni)	0,1%
Misura diretta della tossicità (matrice solida)	Piante – EC50 (14 giorni)	10%
	Vermi – Ec50 (14 giorni)	10%

<sup>a</sup> Limiti per la concentrazione minima di effetto per rifiuti non ecotossici; <sup>b</sup> Concentrazione di effetto, cioè concentrazione che produce un effetto sulla metà (50%) o sul 20% della popolazione.

Pandard P., Devillers J., Charissou A.M., Pouksen V., Jourdain M.J., Ferard J.F., Grand C., Bispo A..  
**Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of waste**  
*Science of the Total Environment* **363** (2006) 114-125

Rifiuti	N° campioni	Codice EER
Rifiuti della preparazione e del trattamento di carne, pesce e altri alimenti di origine animale	1	020203
Rifiuti della lavorazione del legno, della produzione di pannelli e mobili	1	030104*/05
Rifiuti della produzione e lavorazione di polpa, carta e cartone	1	030305
	1	030307
Rifiuti della lavorazione di pelli e pellicce	3	040106
	3	040108
Rifiuti della raffinazione del petrolio	1	050103*
Rifiuti della produzione, formulazione, fornitura e uso di prodotti chimici organici di base	1	070111*/12
Rifiuti della produzione, formulazione, fornitura, uso e della rimozione di pitture e vernici	2	080111*/12
	1	080113*/14
Rifiuti della produzione, formulazione, fornitura e uso di adesivi e sigillanti (inclusi i prodotti impermeabilizzanti)	1	080413*/14
Rifiuti dell'industria del ferro e dell'acciaio	1	100201
	2	100207*/08
	1	100211*/12
	1	100213*/14
Rifiuti della metallurgia termica dell'alluminio	1	100319*/20
	1	100321*/22
	1	100329*/30
Rifiuti della fusione di materiali ferrosi	1	100909*/10
Rifiuti prodotti dalla lavorazione e dal trattamento fisico e meccanico superficiale di metalli e plastiche	2	120114*/15
Terra (compreso il terreno proveniente da siti contaminati), rocce e fanghi di dragaggio	2	170503*/04
Ceneri pesanti o scorie (contenenti sostanze pericolose e non)	5	190111*/12
Rifiuti prodotti da specifici trattamenti chimico-fisici di rifiuti industriali (comprese decromatazione, decianizzazione, neutralizzazione)	1	190205*/06
Rifiuti prodotti dal trattamento aerobico di rifiuti solidi	1	190503
Rifiuti prodotti dagli impianti per il trattamento delle acque reflue, non specificati altrimenti	3	190805
	1	190899

<b>Scopo</b> <sup>1</sup>	Verificare la possibilità di selezionare una batteria minima di saggi ecotossicologici applicando differenti metodologie di analisi statistica multivariata lineare e non-lineare (Hierarchical Cluster Analysis, Principal Component Analysis, Non Linear Mapping Analysis).
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	N.a.
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	N.a.

#### Caratterizzazione fisico-chimica

<b>Parametri analizzati</b>	N.a.
-----------------------------	------

#### Test ecotossicologici

Rifiuto solido		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Anellidi oligocheti</b> - <i>Eisenia fetida</i> /acuto (14gg)	Mortalità / ISO 11268-1	EC <sub>50</sub>
<b>Piante vascolari terrestri</b> - <i>Lactuca sativa</i> /acuto (14gg)	Inibizione germinazione e crescita /ISO 11269-2	EC <sub>50</sub>

Lisciviato		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Batteri bioluminescenti</b> - <i>Vibrio fischeri</i> /acuto (30min)	Inibizione bioluminescenza / ISO 11348-1	EC <sub>50</sub>
<b>Alghe</b> - <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> /cronico (72h)	Inibizione crescita / AFNOR T90-375	EC <sub>20</sub>
<b>Crostacei cladoceri</b> - <i>Daphnia magna</i> /acuto (48h)	Inibizione mobilità / ISO 6341	EC <sub>50</sub>
<b>Crostacei cladoceri</b> - <i>Ceriodaphnia dubia</i> /cronico (7gg)	Inibizione della riproduzione / AFNOR T 90-376	EC <sub>20</sub>

**Conclusioni**

I diversi metodi, lineari e non lineari, di analisi statistica multivariata hanno mostrato che i saggi con *P. subcapitata*, *L. sativa*, *D. magna*, *C. dubia*, *E. fetida* e *V. fischeri* rappresentano una combinazione rilevante di saggi per la valutazione di pericolosità H14. Parimenti, questo approccio statistico ha dimostrato che il numero di test biologici può essere ridotto senza perdita sostanziale di informazioni. Una batteria minima composta da *V. fischeri*, *C. dubia* e *L. sativa* costituisce un ottimo compromesso per la stima dell'ecotossicità dei rifiuti a costi ridotti.

<sup>1</sup> Si tratta di uno studio statistico che prende in considerazione i saggi effettuati su 160 rifiuti raccolti nel database ECOTOX-ANADEME francese. I risultati dei test su 40 tipologie di rifiuti sono stati analizzati ed elaborati per identificare una batteria di test standard di riferimento.



Wilke B.-M., Riepert F., Koch C., Kühne T.  
**Ecotoxicological characterization of hazardous wastes**  
*Ecotoxicology and Environmental Safety* **70** (2008) 283-293

Rifiuti	N° campioni	Cod. EER
Ceneri pesanti, scorie e polveri di caldaia	1	10 01 14
Fanghi da impianto di trattamento dei rifiuti pericolosi	1	19 02 11*
Petrolio	1	13 07 02*
Fanghi da trattamento delle acque reflue urbane	1	19 08 05

<b>Scopo</b>	- Studiare l'applicabilità di batterie selezionate per i rifiuti, costituite da saggi ecotossicologici armonizzati e consolidati. - Comparare due sistemi di classificazione finale della tossicità: TCS e HC <sub>5</sub>
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	- Organismi rappresentativi di differenti livelli trofici - Uso di metodi armonizzati e/o convalidati a livello europeo e/o internazionale - <i>Endpoint</i> differenti - Elevato livello di sensibilità e riproducibilità dei sistemi di saggio
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	1) "Toxicity Classification System" (TCS): Lapa et al., 2002 (vedi tabella 5 del presente rapporto) 2) "Species Sensitivity Distributions (SSD) approach" basato sul modello di estrapolazione DIBAEX di Wagner and Lokke, 1991. Vedi al paragrafo "rifiuti provenienti dai processi termici" nelle Conclusioni del presente rapporto.

#### Caratterizzazione fisico-chimica

**Parametri analizzati** pH, peso secco e contenuto di umidità

#### Test ecotossicologici

##### Rifiuto solido

Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Anellidi oligocheti</b> - <i>Eisenia fetida</i> /acuto (14 gg)	Crescita e mortalità negli adulti/ISO 11268-1	EC <sub>50</sub> /LC <sub>50</sub> convertite in UT <sup>1</sup>
<b>Collemboli</b> - <i>Folsomia candida</i> /subcronico (28 gg)	Mortalità degli adulti e numero di giovanili/ISO 11267	- LC <sub>50</sub> convertita in UT - NOEC
<b>Piante vascolari terrestri</b> - <i>Brassica rapa</i> /subcronico (14-21 gg)	Germinazione e produzione di biomassa/ISO 11269-2	- EC <sub>50</sub> convertita in UT - LOEC
Biomassa microbica del suolo/(6-8 gg)	Curve di respirazione (diversi parametri)/ISO 17155	- EC <sub>50</sub> convertita in UT - LOEC e NOEC
<b>Lisciviato</b>		
<b>Batteri luminescenti</b> - <i>Vibrio fischeri</i> /acuto (30 min)	Inibizione della bioluminescenza/EN ISO 11348	EC <sub>50</sub> convertita in UT
<b>Piante vascolari acquatiche</b> - <i>Lemna minor</i> /cronico (7gg)	Numero di fronde e massa secca/ISO 20079	- EC <sub>50</sub> /LC <sub>50</sub> convertite in UT - NOEC

#### Conclusioni

Tutti i saggi proposti nella batteria, ad eccezione di quelli con *B. rapa* e microflora del suolo, sono risultati idonei a valutare l'ecotossicità dei rifiuti pericolosi studiati. In particolare, i saggi subcronico con *F. candida* (valutazione della riproduzione) e cronico con *L. minor* sono risultati particolarmente sensibili per le tipologie di rifiuto analizzate.

Per la classificazione finale dei rifiuti il sistema TCS è risultato più adatto del modello SSD e, in entrambi i casi, l'uso dei valori di LC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> (trasformati in UT) migliore di quello dei valori di NOEC/LOEC (maggiore dispersione dei valori di NOEC/LOEC).

La pericolosità dei rifiuti secondo il sistema TCS (sulla base dei valori di LC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> e NOEC) è risultata la seguente: petrolio > fanghi trattamento rifiuti pericolosi > ceneri > fanghi trattamento acque reflue. La pericolosità dei rifiuti secondo il sistema SSD (sulla base dei valori di NOEC) è risultata la seguente: Ceneri > petrolio > fanghi trattamento rifiuti pericolosi.

<sup>1</sup> UT: Unità Tossiche 1/E(L)C<sub>50</sub> (Sprague & Ramsay, 1965)

Domene X., Alcañiz J.M., Pilar A.

**Comparison of solid-phase and eluate assay to gauge the ecotoxicological risk of organic waste on soil organism**

*Environmental Pollution* **151** (2008a) 549-558

Rifiuti	N° campioni	Codice EER
Rifiuti prodotti dal trattamento aerobico di rifiuti	3	1905xx
Rifiuti prodotti dal trattamento anaerobico di rifiuti	4	1906xx

<b>Scopo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Comparare le sensibilità dei saggi con organismi acquatici e terrestri per la valutazione ecotossicologica dei rifiuti organici.</li> <li>- Valutare tre differenti modalità di lisciviazione dei rifiuti: con acqua, con metanolo e con diclorometano per la loro capacità di predire la tossicità potenziale del rifiuto in fase solida.</li> <li>- Identificare i componenti organici maggiormente responsabili della tossicità, mediante una correlazione tra risposta biologica e composizione del rifiuto sia in fase solida che come lisciviato.</li> </ul>
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	N.a.
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	N.a.

Caratterizzazione fisico-chimica	Matrice solida	Lisciviato <sup>1</sup>
<b>Parametri analizzati</b>	Peso secco	Metalli pesanti
	pH e conducibilità	IPA, PCB, PCDD/F
	Capacità di ritenzione idrica	DEHP (Di-etilstilfalo)
	NH <sub>4</sub> , N totale	LAS (Linear Alkylbenzene Sulfonate)
	P, K	

Test ecotossicologici		
Lisciviato		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Batteri bioluminescenti</b> - <i>Vibrio fischeri</i> /acuto (15min)	Inibizione bioluminescenza/ISO 11348-1	EC <sub>50</sub>
<b>Collemboli</b> - <i>Folsomia candida</i> /subcronico (28gg)	Sopravvivenza e inibizione riproduzione/ISO 11267	LC <sub>50</sub> EC <sub>50</sub>
<b>Crostacei cladoceri</b> - <i>Daphnia magna</i> /acuto (48h)	Inibizione della mobilità/ISO 6341	EC <sub>50</sub>

Conclusioni
<p>Le scale di sensibilità ottenute con le diverse procedure di lisciviazione (comparando i risultati di tossicità media) sono le seguenti:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- lisciviato (acqua): <i>F.candida</i> inibizione riproduzione &gt; Microtox &gt; <i>F. candida</i> mortalità</li> <li>- lisciviato (metanolo): Microtox &gt; <i>F. candida</i> inibizione riproduzione &gt; <i>F. candida</i> mortalità</li> <li>- lisciviato (diclorometano): Microtox ≈ <i>F. candida</i> inibizione riproduzione ≈ <i>F. candida</i> mortalità</li> </ul> <p>La caratterizzazione fisico-chimica non è sufficiente a definire la potenziale ecotossicità del rifiuto; non si sono riscontrate significative correlazioni tra i risultati dei saggi ecotossicologici e il carico inquinante dedotto dalla caratterizzazione chimico-fisica sia in fase solida che acquosa.</p> <p>La valutazione dell'ecotossicità in matrice solida estrapolata dai dati ottenuti da saggi su lisciviato, è possibile solo nel caso di saggi di tossicità acuta a breve termine che abbiano come endpoint la morte degli organismi.</p>

<sup>1</sup> Il lisciviato ottenuto con tre differenti solventi: acqua, metanolo e diclorometano al fine estrarre tre frazioni con differente solubilità

Domene X., Ramírez W., Mattana S., Alcañiz J.M., Pilar A.

**Ecological risk assessment of organic waste amendments using the species sensitivity distribution from a soil organics test battery**

*Environmental Pollution* **155** (2008b) 227-236

Rifiuti	N° campioni	Codice EER
Rifiuti prodotti dal trattamento aerobico di rifiuti	3	1905xx
Rifiuti prodotti dal trattamento anaerobico di rifiuti	4	1906xx

<b>Scopo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Valutare l'idoneità del metodo SSD (Species Sensitivity Distribution)<sup>1</sup> di stimare la possibilità di riutilizzo dei rifiuti organici come ammendanti del suolo mediante l'applicazione di una batteria di saggi ecotossicologici.</li> <li>- Determinare la relazione esistente tra composizione ed ecotossicità del rifiuto.</li> <li>- Valutare l'influenza dei trattamenti (disidratazione, digestione aerobica e anaerobica) e dei post-trattamenti (compostaggio e essiccazione) sulla potenziale ecotossicità dei rifiuti.</li> </ul>
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	N.a.
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	N.a.

Caratterizzazione fisico-chimica	Matrice solida	Lisciviato
<b>Parametri analizzati</b>	Peso secco, pH, e ritenzione idrica	Conducibilità
	N totale, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Metalli pesanti
	P, K	IPA, PCB, PCDD/F
		DEHP (Di-etilesilftalato)
		LAS (Linear Alkylbenzene Sulfonate)

Test ecotossicologici		
Rifiuto solido		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
Biomassa microbica del suolo/ acuto e cronico (1-28gg)	Indice di respirazione /OECD LG 217	mg CO <sub>2</sub> ·kg.suolo/h
<b>Piante vascolari terrestri - <i>Brassica rapa</i>, <i>Lolium perenne</i>, <i>Trifolium pratense</i>/subcronico (7-28gg)</b>	Inibizione della germinazione e della crescita/OECD LG 208 (LG 207 per la preparazione del suolo)	EC <sub>20</sub>
<b>Collemboli - <i>Folsomia candida</i>/subcronico (28gg)</b>	Mortalità e inibizione della riproduzione/ISO 11267	EC <sub>20</sub>
<b>Anellidi oligocheti - <i>Enchytraeus crypticus</i>/subcronico (28gg)</b>	Mortalità e inibizione della riproduzione/ISO 16387	EC <sub>20</sub>
<b>Anellidi oligocheti - <i>Eisenia andrei</i>/subcronico (14-28gg)</b>	Mortalità e inibizione della riproduzione/ISO 11268-2	NOEC EC <sub>20</sub>

Conclusioni
<p>I saggi d'inibizione della germinazione e crescita con Piante, di riproduzione con Collemboli ed Enchitraeidi e di mortalità con <i>Eisenia</i>, hanno dimostrato di essere sensibili ai differenti rifiuti organici. Al contrario, la respirazione microbica non si è dimostrato un valido <i>endpoint</i> per questa tipologia di rifiuto.</p> <p>Il modello SSD, è risultato adatto alla valutazione del rischio correlato all'utilizzo di rifiuti organici quali ammendanti per i suoli.</p> <p>La tossicità dei rifiuti e quindi la loro possibilità di riutilizzo sui suoli è correlata, nel breve periodo, soprattutto alla bassa stabilità biologica e al contenuto di ione ammoniacale che si sviluppa nel processo di decomposizione della sostanza organica nei suoli, piuttosto che al contenuto di inquinanti. Nel caso specifico, la scarsa stabilità biologica del substrato ha costituito l'elemento determinante per la tossicità dei rifiuti studiati. Ne consegue che una completa stabilizzazione biologica del rifiuto, preventiva al suo riutilizzo, diviene fondamentale per abbatterne la tossicità.</p>

<sup>1</sup> Il metodo SSD (ALdenberg and Jaworska, 2000) assume che il livello di effetto accettabile (sensibilità) delle diverse specie in un ecosistema, segue una funzione di probabilità chiamata "distribuzione della sensibilità delle specie". Ne consegue che dai dati ottenuti su un numero limitato di specie con saggi di laboratorio (assumendo che esse costituiscano un campione casuale dell'intero ecosistema) può essere stimato un accettabile livello di effetto valido per l'intero ecosistema (Van der Hoeven, 2004).

Natal-da-Luz T., Tidona S., Jesus B., Morais P.V., Sousa J.P.

**The use of sewage sludge as soil amendment. The need for an ecotoxicological evaluation**

*Journal of Soil and Sediments* 9 (2009) 246-260

Rifiuti	N° campioni	Codice EER
Fanghi di processo dell'industria olearia	1	020301/03
Fanghi dell'industria galvanica	1	1101XX
Fanghi del trattamento di acque reflue urbane	1	190805

<b>Scopo</b>	- Definizione di una batteria di saggi biologici specifica per la caratterizzazione ecotossicologica dei fanghi - Valutazione dell'ecotossicità dei fanghi ai fini di un loro utilizzo su suoli agricoli
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	- Organismi appartenenti alle comunità biotiche dei suoli. - Organismi appartenenti a differenti livelli trofici
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	N.a.

Caratterizzazione fisico-chimica	Matrice solida
<b>Parametri analizzati</b>	pH e ritenzione idrica
	Capacità di scambio cationico
	Composti organici
	Cd, CrIII-VI, Cu, Pb, Hg, Ni, Zn

Test ecotossicologici		
Rifiuto solido		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Piante vascolari superiori - <i>Avena sativa</i>, <i>Brassica rapa</i>/ subcronico (5 – 42 gg)</b>	Inibizione della germinazione e della crescita / ISO 11269-2	NOEC LOEC EC <sub>20</sub> EC <sub>50</sub>
<b>Anellidi oligocheti - <i>Eisenia andrei</i> /subcronico (7, 28 e 56 gg)</b>	Inibizione della mobilità, della crescita e della riproduzione /Environmental Canada 2002	
<b>Anellidi oligocheti - <i>Eisenia andrei</i>/Avoidance test (acuto)</b>	Comportamento/ISO Draft 17512-1	
<b>Collemboli - <i>Folsomia candida</i>/ subcronico (7 gg)</b>	Inibizione della mobilità/ISO 11267	
<b>Collemboli - <i>Folsomia candida</i>/ Avoidance Test ( acuto)</b>	Comportamento/ISO Draft 17512-1	

Conclusioni
<p>La tossicità dei fanghi dipende dal loro processo di origine: fanghi provenienti dal trattamento delle acque reflue urbane sono risultati non tossici; fanghi dell'industria galvanica sono risultati molto tossici per entrambe le specie di invertebrati e per le piante; i fanghi dell'industria olearia sono risultati non tossici per <i>F. candida</i> ed <i>E. andrei</i>, ma tossici per le piante.</p> <p>In particolare, il test di fuga con i vermi, contrariamente a quanto è noto che la materia organica influenza i risultati del test (i vermi sono attratti dai suoli con maggiore contenuto di sostanza organica), ha dimostrato di essere un <i>endpoint</i> valido nella valutazione di tossicità di questa tipologia di rifiuto. Il saggio con piante è risultato determinante nella valutazione complessiva di tossicità dei fanghi e in modo particolare nel caso di fanghi destinati allo spandimento su suoli agricoli</p>

Wik A., Nilsson E., Torsten K., Tobiesen A., Dave G.

**Toxicity assesement of sequential leachates of tire powder using a battery of toxicity tests amd toxicity identification evaluation.**

*Chemosphere* 77 (2009) 922-927

Rifiuti	N° campioni	Codice EER
Polverino di gomma da pneumatici (contenente sostanze pericolose e non)	3	191211*/12

<b>Scopo</b>	Verificare l'ecotossicità del rifiuto mediante una batteria di saggi biologici.
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	Sono stati utilizzati solo organismi acquatici in quanto la finalità dello studio è valutare l'ecotossicità per l'ambiente acquatico
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	

Caratterizzazione fisico-chimica	Lisciviato
Parametri analizzati	Zn

Test ecotossicologici		
Lisciviato		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
Alghe - <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> /cronico (72h)	Inibizione della crescita / ISO 8692	EC <sub>50</sub>
Crostacei cladoceri - <i>Ceriodaphnia dubia</i> /cronico (48h e 9gg)	Mortalità, inibizione della crescita e della riproduzione / metodo sviluppato da Mount e Norberg (1984) come modificato da Unger ed Ek (1994)	EC <sub>50</sub>
Crostacei cladoceri - <i>Daphnia magna</i> /acuto (48h)	Inibizione della mobilità/ ISO 6341	EC <sub>50</sub>
Pesci - <i>Danio rerio</i> /acuto (48h)	Tossicità sulle uova /ISO 15088	EC <sub>50</sub>

Conclusioni
La sensibilità degli organismi e delle loro differenti fasi di sviluppo risulta variabile, ma conferma l'ecotossicità in ambiente acquatico del rifiuto. La tossicità del lisciviato dipende probabilmente dalla concentrazione di Zn e di altri composti organici liposolubili. La scala di sensibilità dei diversi saggi applicati è risultata la seguente: Crostacei: <i>C. dubia</i> inibizione riproduzione 9 gg > Crostacei: <i>C. dubia</i> mortalità 9 gg > Alghe: <i>P. subcapitata</i> > Crostacei: <i>C. dubia</i> acuto > Crostacei: <i>D. magna</i> acuto. Il test con la specie ittica <i>D. rerio</i> è stato escluso dalla valutazione in quanto si è dimostrato non sensibile per la maggior parte dei lisciviati analizzati.

Römbke J., Moser Th., Moser H.

**Ecotoxicological characterisation of 12 incineration ashes using 6 laboratory tests**

*Waste Management* 29 (2009) 2475-2482

Rifiuti	N° campioni	Cod EER
Ceneri pesanti e scorie (contenenti sostanze pericolose e non)	12	190111*/190112

<b>Scopo</b>	- Selezionare un'ideale batteria di saggi per la caratterizzazione ecotossicologica dei rifiuti - Individuare una metodologia affidabile per la preparazione dei lisciviati - Correlare le analisi chimiche e i risultati dei saggi ecotossicologici
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	- Organismi rappresentativi di differenti livelli trofici. - Uso di metodi armonizzati e/o convalidati a livello europeo e/o internazionale
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	N.a.

Caratterizzazione fisico-chimica	Matrice solida	Lisciviato
<b>Parametri analizzati</b>	pH	pH
	TOC	N ammoniacale
	As, Cd, Cr, Cu, Hg, Zn, Pb	Cr, Cu, Zn, Pb
		Cl
		Nitrati e Solfati

Test ecotossicologici		
Rifiuto solido		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Piante</b> <i>Avena sativa</i> e <i>Brassica rapa</i> /cronico (14gg)	Inibizione germinazione e crescita / ISO 11269-2	EC <sub>30</sub> espressa in LID <sup>1</sup>
<b>Vermi</b> <i>Eisenia fetida</i> /acuto (14 gg)	Mortalità / ISO11268-1	EC <sub>20</sub> espressa in LID
<b>Batteri</b> <i>Arthrobacter globiformis</i> /acuto	Inibizione attività enzimatica / DIN 38412-L48	EC <sub>20</sub> - espressa in LID
Lisciviato		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Alghe</b> <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> e <i>Desmodesmus subspicatus</i> /cronico (72h)	Inibizione della crescita / ISO 8692	EC <sub>20</sub> espressa in LID
<b>Crostacei</b> <i>Daphnia magna</i> /acuto	Inibizione mobilità / ISO 6341	EC <sub>10</sub> - espressa in LID
<b>Batteri luminescenti</b> <i>Vibrio fischeri</i> /acuto	Inibizione bioluminescenza / ISO 11348-1	EC <sub>20</sub> - espressa in LID

**Conclusioni**  
 Comparando i valori di LID, i saggi con organismi terrestri su rifiuto solido (Piante > *A. globiformis* > *E. fetida* acuto) sono risultati più sensibili di quelli su lisciviato con organismi acquatici. In particolare, la maggior parte dei campioni di ceneri non mostra alcuna tossicità né con il test algale, né con i batteri bioluminescenti, ma solo con il crostaceo *Daphnia magna*. Ai fini della classificazione dei campioni di ceneri come ecotossici o no, vengono proposti valori limite LID pari a >8 per i saggi con organismi terrestri e >4 per i saggi con organismi acquatici. Non si osserva alcuna correlazione tra gli effetti ecotossicologici indagati e le analisi chimiche effettuate sui campioni di ceneri.

<sup>1</sup> LID: Lowest Ineffective Dilution, è la prima diluizione in cui non si riscontra nessun effetto per gli organismi. LID = 1 è il campione tal quale, non diluito; LID = 2 è una miscela di rifiuto per il 50% e acqua/terreno di crescita degli organismi al 50%; ecc.. Per i dettagli si veda capitolo 3 di questo rapporto.

Wang F., Leung A.O.W., Wu M.S., Yang M.S., Wong M.H.  
**Chemical and ecotoxicological analyses of sediments and elutriates of contaminated rivers due to e-waste recycling activities using a diverse battery bioassay**  
*Environmental Pollution* **157** (2009) 2082-2090

Rifiuti	N° campioni	Codice EER
Terra, rocce e fanghi di dragaggio (sedimenti fluviali contaminati)	42	170505*/06

<b>Scopo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Comparare e valutare la tossicità di campioni di sedimento mediante una batteria composta da quattro organismi di differenti livelli trofici. I campioni di sedimento provengono da due fiumi in cui sono scaricate le acque provenienti da un impianto per il recupero dei rifiuti da apparecchiature elettriche ed elettroniche (RAEE) e, pertanto, contaminati con elevati livelli di metalli pesanti e IPA<sup>1</sup> e caratterizzati da pH molto acido.</li> <li>- Valutare i livelli di contaminazione da metalli pesanti e IPA</li> <li>- Quantificare la biodisponibilità dei metalli pesanti mediante il metodo di estrazione sequenziale</li> </ul>
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Organismi rappresentativi di differenti livelli trofici</li> <li>- Facilità di reperimento degli organismi</li> <li>- Sensibilità degli organismi</li> </ul>
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	N.a.

Caratterizzazione fisico-chimica	Matrice solida
	pH
	Metalli pesanti
	NH <sub>4</sub>
	PO <sub>4</sub>
	TOC
	IPA

<sup>1</sup> IPA: Idrocarburi Policiclici Aromatici

Test ecotossicologici		
Rifiuto solido		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Crostacei ostracodi - <i>Heterocypris incongruens</i>/cronico (6gg)</b>	Mortalità e inibizione della crescita (effetto subletale) /Ostracodtookit – Creasel, 2001	LC <sub>50</sub>
<b>Pesci - <i>Oreochromis mossambicus</i>/acuto (24 e 48 h)</b>	Concentrazione epatica di metalli (Hepatic Metallothionein test – Yang et al., 1993)	LC <sub>50</sub> EC <sub>50</sub>
Lisciviato		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Batteri bioluminescenti - <i>Vibrio fischeri</i>/acuto (5-15min)</b>	Inibizione bioluminescenza/ n.r. <sup>1</sup>	EC <sub>50</sub>
<b>Alghe - <i>Selenastrum capricornutum</i>/cronico (72h)</b>	Inibizione della crescita/NIWA 1998	EC <sub>50</sub>

<sup>1</sup>n.r.: non riportata dagli Autori: per lo svolgimento del test viene menzionato solo il metodo Microtox.

Conclusioni
<p>I saggi, con <i>V. fischeri</i> e <i>S. capricornutum</i>, eseguiti su lisciviato hanno messo in evidenza una maggiore tossicità nei campioni di sedimento (campioni del fiume Nanyang: NY) con elevato contenuto di metalli pesanti in condizioni di basso pH. Al contrario il saggio con il crostaceo <i>H. incongruens</i> eseguito sui campioni di sedimento tal quale, ha evidenziato una maggiore tossicità nei campioni del fiume Lianjiang (campioni LJ), dovuta all'elevata biodisponibilità dei metalli pesanti, degli IPA e di altri POP<sup>1</sup>.</p> <p>Il saggio epatico con la specie ittica <i>O. mossambicus</i> si è dimostrato altamente sensibile nel determinare l'esposizione a metalli pesanti e si è osservata un'elevata correlazione tra sintesi epatica di metallothioneina e concentrazioni di metalli pesanti, in particolare Cu, Zn e Pb nei sedimenti analizzati.</p>

<sup>1</sup>POP: Persistent Organic Pollutant

Pablos M.V., Fernández C., del Mar Babín M., Navas J.M., Carbonell G., Martini F., García-Hortigüela P., Tarazone J.V.

**Use of a novel battery of bioassays for the biological characterisation of hazardous wastes**

*Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (2009) 1594-1600

Rifiuti	N° campioni	Codice EER <sup>1</sup>
Rifiuti liquidi derivati da sostanze impiegate come solventi	3	14XXXX
Rifiuti solidi derivati da industrie e laboratori	4	N.d.
Ceneri da inceneritore	1	1901XX*
Suolo contaminato	1	170503*

<b>Scopo</b>	Sviluppare una batteria di saggi ecotossicologici, per uno screening rapido e a basso costo dei rifiuti pericolosi, comprendente organismi acquatici e sistemi <i>in vitro</i> , senza alcuna caratterizzazione chimica preliminare dei campioni analizzati.
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	- Organismi rappresentativi di differenti livelli trofici - Utilizzo di sistemi <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	N.a.

<b>Caratterizzazione fisico-chimica</b>	N.a.
---	------

Test ecotossicologici		
Rifiuti liquidi e lisciviati		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Crostacei cladoceri</b> - <i>Daphnia magna</i> /acuto (24 h)	Immobilizzazione/ISO 6341	EC <sub>50</sub> convertita in UT <sup>2</sup>
<b>Anfibi</b> - <i>Xenopus laevis</i> /acuto (96 h)	Mortalità larve allo stadio 47/metodo interno	LD <sub>50</sub> convertita in UT
Linea cellulare di pesce RTG-2 <sup>3</sup> / saggi di citotossicità basale: Neutral Red assay (NR), EROD assay, β-galattosidasi assay (72 h)	-NR: vitalità cellulare (Borenfreund and Puerner, 1985); -EROD: stimolazione del citocromo CYP1A misurato come attività 7-etossiresorufin-o-deetilasi (Babín and Tarazona, 2005); -β-gal: difese cellulari misurate come livelli dell'enzima β-galattosidasi (Babín and Tarazona, 2005).	EC <sub>50</sub> convertita in UT
Linea cellulare di mammifero H4IIE <sup>4</sup> /Dr CALUX test <sup>5</sup> (24 h)	Emissione della luminescenza (proporzionale all'attivazione del recettore aril idrocarburico, AhR da parte dei composti diossinici eventualmente presenti nei campioni analizzati)/ BioDetection Systems, Amsterdam, The Netherlands	EC <sub>50</sub> convertita in UT

Conclusioni
<p>I risultati di ecotossicità dimostrano che la batteria proposta costituita da saggi <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>, è idonea a evidenziare la tossicità dei campioni di rifiuto. In particolare, <i>D. magna</i> si dimostra l'organismo maggiormente sensibile perchè rileva tossicità nell'80% dei campioni analizzati. Meno sensibile è risultato il saggio con <i>X. laevis</i> (positivo per il 60% dei campioni). I saggi EROD and β-gal con la linea cellulare di pesce RTG-2 hanno mostrato effetto solo nel 26,6% dei campioni, mentre il saggio con NR è risultato più sensibile (positivo per il 53,3% dei campioni). DR CALUX test è risultato positivo nel 50% dei campioni.</p> <p>La comparazione tra saggi <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> conferma la migliore capacità dei primi nel rilevare la tossicità dei campioni, tuttavia il saggio con rosso neutro e DR CALUX che hanno prodotto positività confrontabili con quelle ottenute <i>in vivo</i> da <i>Xenopus</i>, possono essere considerati buoni candidati da inserire nelle batterie di saggi per la valutazione di ecotossicità dei rifiuti.</p>

<sup>1</sup> Gli Autori fanno riferimento alle categorie stabilite nell'allegati IA e IB della direttiva 1991/689/CEE (riportate tra parentesi) abrogata dalla direttiva 2008/98/CE. Nel caso specifico si è provveduto, dove possibile, a stabilire la categoria dell'EER corrispondente, così come previsto nella normativa europea e nazionale vigente, in materia di rifiuti.

<sup>2</sup> UT: Unità Tossiche 1/E(L)C<sub>50</sub> (Sprague & Ramsay, 1965);

<sup>3</sup> RTG-2: Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Gonad cell line;

<sup>4</sup> H4IIE rat hepatoma cell line (Boronat et al., 2007).

<sup>5</sup> DR-CALUX test si basa sull'uso della linea H4IIE transfettata con il gene per la luciferasi sotto diretto controllo dei geni che rispondono ai composti diossinici (Dioxin Responsive Elements, DRE)



Koči V., Mocová K., Kulovaná M., Vosáhlavá S.  
**Phytotoxicity tests of solid wastes and contaminated soils in the Czech Republic**  
*Environmental Science and Pollution Research* 17 (2010) 611-623

Rifiuti	N° campioni	Codice EER
Suolo contaminato di diversa origine	5	170503*/04
Fanghi da trattamento acque industriali	1	190813*/14
Sedimenti fluviali contaminati	1	170505*/06
Scorie di altoforno	1	100202
Ceneri di caldaia da impianto di incenerimento (contenenti sostanze pericolose e non)	1	190115*/16

<b>Scopo</b>	- Mettere a confronto differenti test di fitotossicità (su solido e lisciviato) per valutare la tossicità di suoli contaminati di diversa origine e per identificare un'appropriata batteria da applicare ai rifiuti. - Verificare gli effetti dell'inquinamento dei suoli sulla crescita e lo sviluppo di varie specie di piante.
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	Rilevanza ecologica e sensibilità degli organismi
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	Viene proposta una classificazione di tossicità per i rifiuti e i suoli contaminati basata sulle sette classi seguenti: <b>A1</b> nessun effetto inibitorio osservato; anche il campione non diluito non causa effetti inibitori >5% <b>A2</b> effetto inibitorio non >30% nell'intervallo di [500-1000 ml/L (g/L, g/kg)] <b>A3</b> effetto inibitorio non >30% nell'intervallo [100-500 ml/L (g/L, g/kg)] <b>B</b> effetto inibitorio >30% nell'intervallo [100-500 ml/L (g/L, g/kg)] e EC <sub>50</sub> compreso tra 100-500 ml/L(g/L, g/kg) <b>C</b> EC <sub>50</sub> compreso tra 10-100 ml/L (g/L, g/kg) <b>D</b> EC <sub>50</sub> compreso tra 1-10 ml/L (g/L, g/kg) <b>E</b> EC <sub>50</sub> <1 ml/L (g/L, g/kg)]

Caratterizzazione fisico-chimica	Matrice solida	Lisciviato <sup>1</sup>
<b>Parametri analizzati</b>	BTEX	DOC
	IPA e PCB	Cl, F
	TOC	SO <sub>4</sub>
	EOX	As, B, Ba, Cd, Co, Crtot, Cu, Hg, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, V, Zn
	Metalli	pH e conducibilità

BTEX: Petroleum-derived compounds (benzene, toluene, etilbenzene e xilene); EOX: Extractable Organic Bonded Halogens

<b>Test ecotossicologici</b>		
<b>Rifiuto solido</b>		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Piante vascolari terrestri, (dicotiledoni) - <i>Lactuca sativa</i> e <i>Sinapsis alba</i> - <i>Hordeum vulgare</i> e <i>Triticum aestivum</i> /acuto (7 gg)</b>	Inibizione della crescita radicale/ISO11269-1	EC <sub>50</sub>
<b>Lisciviato</b>		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Alghe - <i>Desmodesmus subspicatus</i>/cronico (72h)</b>	Inibizione della crescita/ISO 8692	EC <sub>50</sub>
<b>Piante vascolari acquatiche - <i>Lemna minor</i>/cronico (7gg)</b>	Inibizione della crescita (n° di fronde e contenuto di Clorofilla)/ OECD LG 221	EC <sub>50</sub>
<b>Piante vascolari terrestri - <i>Sinapsis alba</i>/acuto (14 gg)</b>	Inibizione dell'allungamento radicale/ CEMD (Czech Environmental Ministry Directive, Ministry of Environment of the Czech Republic) 2003	EC <sub>50</sub>

---

### Conclusioni

Comparando i diversi saggi di fitotossicità, viene messa a punto una batteria costituita da due saggi su lisciviato con Alghe (*D. subspicatus*) e Piante acquatiche (*L. minor*) e due saggi su matrice solida con Piante delle specie *L. sativa* e *H. vulgare*. Tale batteria viene proposta dagli Autori, in sostituzione dei saggi comunemente effettuati sulla base delle normative interne al proprio Paese (Cecoslovacchia).

Si ribadisce l'importanza di affiancare ai saggi su lisciviato, quelli su matrice solida per aumentare la sensibilità della batteria utilizzata.

<sup>1</sup> lisciviato preparato secondo la norma DIN 38414 (1984)

Stiernström S., Hemström K., Wik K., Carlsson G., Bengtsson B.-E., Breitholtz M.  
**An ecotoxicological approach for hazard identification of energy ash**  
*Waste Management* 31 (2011) 342-352

Rifiuti	N° campioni	Codice EER
Ceneri leggere contenenti sostanze pericolose e non da incenerimento di rifiuti solidi urbani e industriali	4	190113*/14
Ceneri pesanti e scorie (contenenti sostanze pericolose e non) da incenerimento di rifiuti solidi urbani	2	190111*/12
Ceneri leggere da combustione di biomasse	1	1001XX <sup>1</sup>

<b>Scopo</b>	Valutare l'applicabilità di una batteria composta da saggi con organismi acquatici per stimare l'ecotossicità potenziale di scorie e ceneri da incenerimento di rifiuti e combustione di biomasse di differente origine ed età (1 settimana, 1 mese, 3 mesi, 1 anno, 4 anni e 15 anni)
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	Organismi rappresentativi di differenti livelli trofici (viene proposto l'uso del crostaceo copepode <i>N. spinipes</i> capace di sopportare ampie variazioni di salinità e di pH)
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	N.a.

Caratterizzazione fisico-chimica	Lisciviato <sup>2</sup>
<b>Parametri analizzati</b>	pH
	Ossigeno
	Salinità
	Attività microbica
	Cl, Na e solfati
	TOC
	Metalli

Test ecotossicologici		
Lisciviato <sup>2</sup>		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Batteri bioluminescenti</b> - <i>Vibrio fischeri</i> /acuto (5-15 minuti)	Inibizione bioluminescenza/ISO 11348-1	EC <sub>50</sub>
<b>Alghe</b> - <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> /cronico (72h)	Inibizione della crescita/OECD LG 201	EC <sub>50</sub>
<b>Crostacei copepodi</b> - <i>Nitocra spinipes</i> /acuto (96h)	Mortalità/ SIS (Swedish standard 1991)	LC <sub>50</sub>
<b>Crostacei copepodi</b> - <i>Nitocra spinipes</i> /(subcronico 6gg)	Inibizione dello sviluppo larvale/ Breitholtz and Bengtsson, 2001, Breitholtz and Wollenberger, 2003	NOEC
<b>Pesci</b> - <i>Danio rerio</i> /embriotossicità (24-48-144h)	Tossicità su embrioni/ OECD Draft proposal 2006	NOEC

**Conclusioni**  
 Le risposte osservate nei saggi ecotossicologici sono risultate coerenti con le analisi chimiche. I campioni più tossici sono risultati quelli di ceneri leggere (da incenerimento di rifiuti solidi urbani) di 1 settimana e quelli meno tossici le ceneri pesanti (da incenerimento di rifiuti solidi urbani) di 15 anni.  
 I test (sub)cronici sono risultati più sensibili dei test acuti e quindi vengono indicati come preferibili per la valutazione di pericolosità dei rifiuti (H14).

<sup>1</sup>Dalla descrizione del rifiuto non è possibile identificare più specificamente la tipologia; esso rimane pertanto definito solo come macrocategoria

<sup>2</sup>Lisciviato preparato secondo il metodo ER-H sviluppato da Gamst et al., 2007.

Moser H., Röembke J., Donnevert G. and Becker R.,  
**Evaluation of biological methods for a future methodological implementation of the Hazard criterion H14 “ecotoxic” in the European waste list (2000/532/CE)**  
*Waste Management & Research* **29** (2011) 180-187

Rifiuti	N° campioni	Codice EER
Ceneri pesanti (contenenti sostanze pericolose e non) da incenerimento di rifiuti	1	190111*/12
Legno trattato con preservanti (rifiuti della lavorazione del legno)	1	030104*/05
Suolo contaminato	1	170503*/04

<b>Scopo</b>	Definire una batteria di saggi biologici per la caratterizzazione ecotossicologica dei rifiuti utilizzando la norma EN 14735 “Caratterizzazione dei rifiuti - Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche” mediante circuito di interconfronto. In particolare: 1) Convalidare la metodica di preparazione dei substrati di rifiuto definita dalla norma EN 14735. 2) Valutare l’idoneità della batteria di base (composta da tre saggi su lisciviato e 3 saggi su matrice solida) in termini di fattibilità, sensibilità e applicabilità ai rifiuti dei metodi esistenti. 3) Valutare l’incertezza dei risultati ottenuti dai saggi ecotossicologici.
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	- Rilevanza ecologica delle specie - Sensibilità degli organismi - Riproducibilità dei risultati - Fattibilità tecnico/economica (semplicità di esecuzione e costi) - Uso di metodi armonizzati e/o convalidati a livello europeo e/o internazionale
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	N.a.

Caratterizzazione fisico-chimica	Lisciviato
Parametri analizzati	Non riportato nel presente articolo

Test ecotossicologici <sup>1</sup>		
Rifiuto solido		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Piante vascolari terrestri - <i>Avena sativa</i>, <i>Brassica rapa</i>/subcronico (14-21gg)</b>	Inibizione germinazione e crescita/ISO 11269-2	EC <sub>50</sub>
<b>Anellidi oligocheti - <i>Eisenia fetida</i>, <i>E. andreeii</i>/acuto (14gg)</b>	Mortalità/ISO 11268-1	EC <sub>50</sub>
<b>Anellidi oligocheti - <i>Eisenia fetida</i>, <i>E. andreeii</i>/ subcronico (56gg)</b>	Inibizione della riproduzione /ISO 11268-2	EC <sub>50</sub>
<b>Anellidi oligocheti – <i>Eisenia fetida</i> / Avoidance test (acuto)</b>	Comportamento/ISO 17512-1	EC <sub>50</sub>
<b>Anellidi oligocheti – <i>Enchytraeus albidus</i>, <i>E. crypticus</i>/subcronico (42gg)</b>	Inibizione della riproduzione/ISO 16387	EC <sub>50</sub>
<b>Collemboli – <i>Folsomia candida</i>/ subcronico (28g)</b>	Mortalità e inibizione della riproduzione/ ISO 11267	
<b>Batteri – <i>Arthrobacter globiformis</i> acuto (&lt; 24 h)</b>	Attività deidrogenasica DIN 38412-48	EC <sub>50</sub>
Lisciviato		
Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Batteri bioluminescenti - <i>Vibrio fischeri</i> / acuto (30min)</b>	Inibizione della bioluminescenza / ISO 11348-1/2/3	EC <sub>50</sub>
<b>Alghe - <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> e <i>Desmodesmus subspicatus</i>/cronico (72h)</b>	Inibizione della crescita / ISO 8692	EC <sub>50</sub>

<b>Crostacei cladoceri - <i>Daphnia magna</i>/acuto (24-48h)</b>	Inibizione della mobilità/ISO 6341	EC <sub>50</sub>
<b>Crostacei cladoceri - <i>Ceriodaphnia dubia</i>/cronico (7gg)</b>	Inibizione della crescita/AFNOR 90-376 (ISO/NWI 20665)	EC <sub>50</sub>
<b>Piante vascolari acquatiche - <i>Lemna minor</i>/cronico (7gg)</b>	Crescita (numero di fronde, area della fronda o peso secco o clorofilla) ISO 20079	EC <sub>50</sub>
<b>Batteri - <i>Pseudomonas putida</i> /cronico (16 ± 1 h)</b>	Inibizione della crescita ISO 10712	EC <sub>50</sub>
<b>Batteri - <i>Salmonella typhimurium</i>/Umu test (4 h)</b>	Genotossicità/ISO 13829	EC <sub>50</sub>
<b>Rotiferi - <i>Brachionus calyciflorus</i>/cronico (48 h)</b>	Inibizione della crescita/ISO 20666	EC <sub>50</sub>

<sup>1</sup> In arancione sono evidenziati i saggi della batteria di base

<b>Conclusioni</b>
<p>I risultati dello studio di convalida, ottenuti su 64 laboratori, dimostrano che la norma EN 14735 è applicabile alla valutazione di ecotossicità dei rifiuti.</p> <p>I risultati dei saggi della batteria di base e dei saggi addizionali sono consultabili nella pubblicazione di Moser and Roembke, 2009 e sinteticamente descritti nel capitolo 2 del presente rapporto ISPRA.</p> <p>In base ai risultati dell'interconfronto viene raccomandata la seguente batteria di saggi:</p> <p><u>Lisciviato</u>: Alghe, Crostaceo <i>D. magna</i>, test acuto; , Batteri <i>S. typhimurium</i>, Umu test</p> <p><u>Su rifiuto solido</u>: Batteri <i>A. globiformis</i>, Anellidi <i>E. fetida/andrei</i> Avoidance Test e Piante <i>B. rapa</i></p>

Pablos M.V., Martini F., Fernández C., Babín M.M., Herraes I., Miranda J., Martínez J. Carbonell G., San-Segundo L., García-Hortiguera P., Tarazona J.V.  
**Correlation between physicochemical and ecotoxicological approaches to estimate landfill leachates toxicity**  
*Waste Management* **31** (2011) 1841-1847

Rifiuti	N° campioni	Codice EER
Percolato di discarica	21	190702*/03

<b>Scopo</b>	- Valutare della tossicità di percolati di discarica, mediante una batteria di saggi ecotossicologici. - Studiare la possibile correlazione tra la caratterizzazione chimico-fisica ed ecotossicologica utilizzando l'analisi statistica Principal Component Analysis (PCA), al fine di migliorare la gestione (ecogestione) del percolato.
<b>Criteri di selezione della batteria</b>	- Test consolidati e sensibili - Organismi rappresentativi di differenti livelli trofici ed appartenenti a taxa rilevanti. - Utilizzo di sistemi in "vivo" e in "vitro".
<b>Sistemi utilizzati per la classificazione finale di tossicità</b>	TCS (Toxicity Classification System) di Lapa et al., 2002 che modifica Persoone et al., 2003 (vedi tabella 5 del presente Rapporto).

#### Caratterizzazione fisico-chimica

<b>Parametri analizzati</b>	pH
	Conducibilità
	COD
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , SO <sub>4</sub> , NH <sub>3</sub> , NO <sub>3</sub> , HCO <sub>3</sub> , Cl <sup>-</sup>
	Alcalinità

#### Test ecotossicologici

##### Rifiuto liquido

Organismo/Tipo di saggio	Parametri misurati/Norma di riferimento	Espressione dei risultati
<b>Crostacei Cladoceri</b> - <i>Daphnia magna</i> /acuto (48h)	Inibizione mobilità / ISO 6341:1996	EC <sub>50</sub> convertito in UT <sup>1</sup>
<b>Anfibi</b> - <i>Xenopus laevis</i> /acuto (96h)	Mortalità / metodo descritto da Pablos et al., 2009	EC <sub>50</sub> convertito in UT
RTG2/Linea cellulare di pesce: Neutral Red Assay (NR), EROD Assay, β-galattosidasi Assay (72h)		EC <sub>50</sub> convertito in UT

#### Conclusioni

Si è dimostrata l'efficacia della batteria scelta nel caratterizzare il percolato di discarica. L'analisi PCA applicata alla relazione tra parametri chimico-fisici e caratterizzazione ecotossicologica ha permesso di identificare i parametri fisico-chimici più importanti (peso maggiore) rispetto a tutti gli altri (Cl<sup>-</sup>, alcalinità, conducibilità, NH<sub>3</sub> e COD). L'analisi di regressione ha valutato la correlazione tra i parametri fisico-chimici di maggior peso e i valori di UT ottenuti nei saggi con *Daphnia*, *Xenopus* e NR assay, mostrando valori compresi tra 0,55 (correlazione moderata) e 0,86 (forte correlazione) per NRU e *X. Laevis* / *D. magna*, rispettivamente. L'applicazione "dell'analisi di discriminazione" ha dimostrato che i parametri chimico-fisici individuati possono essere utilizzati per predire la tossicità acuta potenziale dei percolati sugli organismi acquatici. Campioni di percolato con valori elevati dei parametri identificati in base a questo metodo, possono essere direttamente classificati come potenzialmente tossici e gestiti di conseguenza.

<sup>1</sup> UT: Unità Tossiche 1/E(L)C<sub>50</sub> (Sprague & Ramsay, 1965)

## 4. CONCLUSIONI

Sulla base della bibliografia selezionata nel presente rapporto, nella tabella 23 sono riportate, raggruppate per categoria, tutte le tipologie di rifiuto analizzate da differenti batterie di saggi ecotossicologici.

**Tabella 23** – *Tipologie di rifiuto analizzate nei riferimenti bibliografici selezionati*

Tipologia di rifiuto	N° tot. campioni analizzati	Numero e riferimenti bibliografici
Scorie, ceneri leggere e pesanti da incenerimento	40	9 Ferrari et al., 1999; Lapa et al., 2002; Ferrari and Ferard., 2005; Pandard et al., 2006; Pablos et al., 2009; Römbke et al., 2009; Stiernström et al., 2011; Moser et al., 2011; Koci et al., 2010
Rifiuti provenienti da processi termici	15	6 Rojičková-Padrťová et al., 1998; Ferrari and Ferard. 2005; Pandard et al., 2006; Koči et al., 2010; Stiernström et al., 2011; Wilke et al., 2008
Fanghi dal trattamento di acque di origine urbana e industriale	9	4 Natal-da-Luz et al., 2009; Rojičková-Padrťová et al., 1998; Koči et al., 2010; Wilke et al., 2008;
Suolo contaminato (compresi sedimenti fluviali)	58	6 Maxam et al., 2000; Pandard et al., 2006; Wang et al., 2009; Pablos et al., 2009; Koči et al., 2010; Moser et al., 2011
Rifiuti prodotti da impianti di trattamento dei rifiuti, impianti di trattamento delle acque reflue	42	5 Wik et al., 2009; Pandard et al., 2006; Domene et al., 2008a; Domene et al., 2008b; Manusadzianas et al., 2003
Petrolio, rifiuti della raffinazione del petrolio e prodotti energetici. Solventi organici, oli esauriti e residui di combustibili liquidi	10	4 Pandard et al., 2006; Wilke et al., 2008; Pablos et al., 2009; Juvonen et al., 2000
Percolato da discarica	46	3 Bernard et al., 1997; Isidori et al., 2003; Pablos et al., 2011
Rifiuti della lavorazione del legno, carta e cartone	4	2 Pandard et al., 2006; Moser et al., 2011
Rifiuti dell'industria fotografica e della produzione di adesivi, sigillanti, e inchiostri per stampa	4	1 Pandard et al., 2006
Rifiuti della lavorazione tessile e delle pelli	6	2 Pandard et al., 2006
Rifiuti prodotti da agricoltura e agroindustria	2	2 Pandard et al., 2006; Natal-da-Luz et al. 2009
Rifiuti dei processi chimici organici e inorganici	4	3 Pandard et al., 2006; Natal-da-Luz et al. 2009; Schultz et al. 2002
Rifiuti prodotti dal trattamento fisico-chimico superficiale di metalli ed altri materiali	3	1 Pandard et al., 2006

### *Scorie, ceneri pesanti e leggere da incenerimento*

La tecnologia dei processi di incenerimento provoca la formazione di ceneri pesanti e scorie per il 30% del peso iniziale dei rifiuti e di ceneri leggere per il 5%. In Europa, solo nel 2009, la produzione stimata di ceneri pesanti è risultata pari a 16 milioni di tonnellate/anno (Spohn and Gurin, 2011). Nella tabella 24 sono riportati, per singolo Paese, i quantitativi di rifiuti sottoposti ad incenerimento e le relative quantità di ceneri pesanti prodotte negli anni 2008-2009.

Le ceneri (pesanti e leggere) e le scorie derivanti dai processi di incenerimento dei rifiuti urbani, sono classificate come “voci specchio” (*mirror entries*: rifiuti che possono essere pericolosi o non pericolosi in funzione della presenza o meno di sostanze pericolose).

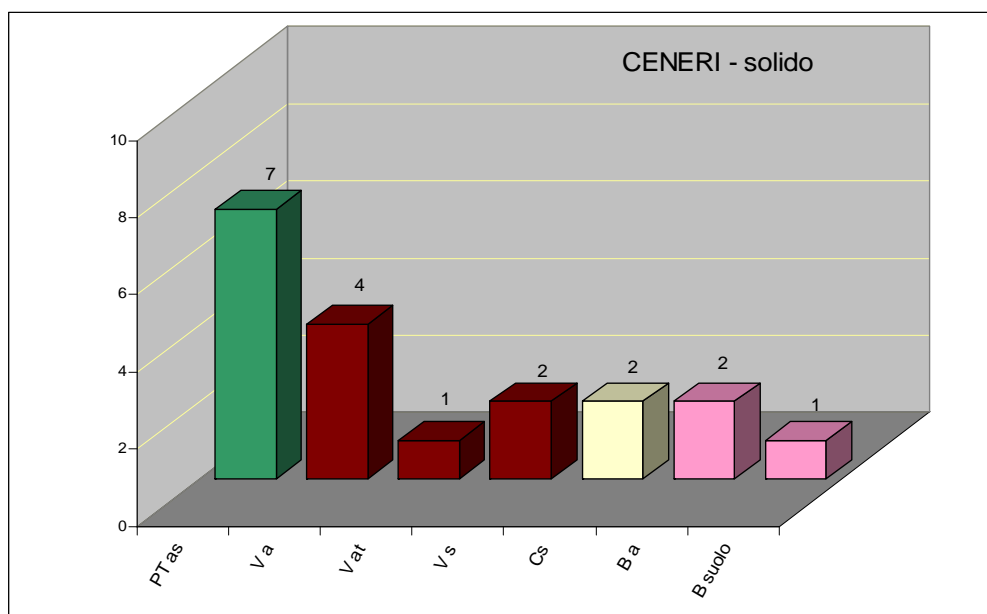
In base all'Elenco Europeo dei rifiuti, esse appartengono alla categoria designata dal codice 19 01 “rifiuti da incenerimento o pirolisi di rifiuti” che, negli studi da noi analizzati, ha compreso: ceneri di caldaia, contenenti sostanze pericolose (19 01 15\*), ceneri pesanti e scorie contenenti sostanze pericolose (19 01 11\*), ceneri pesanti e scorie, diverse da quelle di cui alla voce 19 01 11 (19 01 12), ceneri leggere contenenti sostanze pericolose (19 01 13\*), ceneri leggere diverse da quelle di cui alla voce 19 01 13 (19 01 14). L'asterisco indica presenza di sostanze pericolose.

**Tabella 24** – Ceneri pesanti prodotte nei diversi Paesi Europei (2008-2009)  
 Tratta e modificata da <http://www.waste-management-world.com/index/current-issue.html>

Paese	Rifiuti sottoposti a incenerimento (milioni di ton)	Ceneri pesanti (milioni di ton)
Belgio (2009)	2,80	0,53
Repubblica Ceca (2009)	0,36	0,09
Danimarca (2008)	3,59	0,63
Finlandia (2009)	0,27	0,05
Francia (2008)	11,60	2,7
Germania (2009)	18,94	4,74
Ungheria (2008)	0,40	0,09
Italia (2008)	4,12	0,80
Olanda (2009)	6,2	1,5
Norvegia (2009)	0,87	0,13
Portogallo (2009)	1,1	0,20
Svezia (2009)	4,50	0,74

Dove non è stato possibile identificare in modo specifico il rifiuto è stata riportata solo la macrocategoria di appartenenza (ad es. 19 XX XX o 19 01 XX).

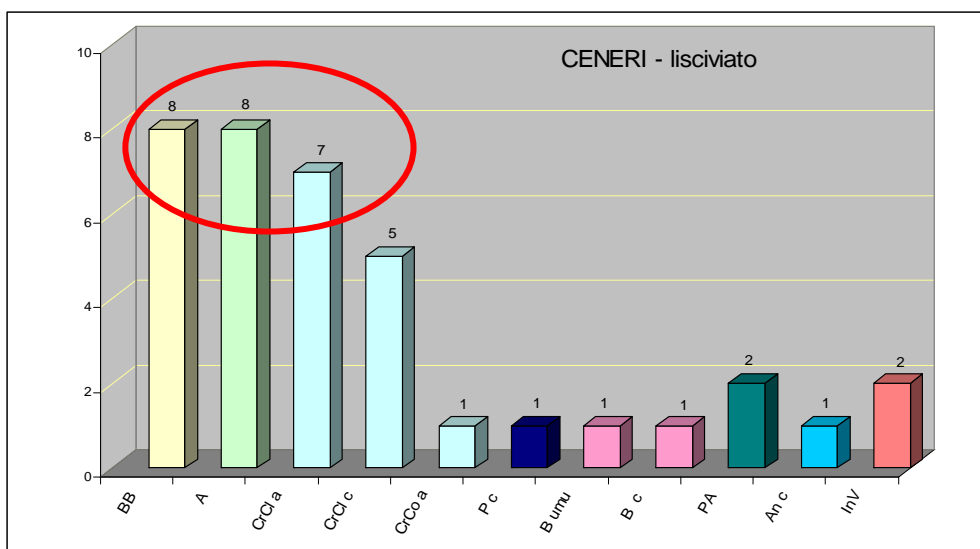
Questa tipologia di rifiuto è risultata la più studiata. Gli organismi e i relativi saggi utilizzati per la caratterizzazione ecotossicologica delle ceneri sono mostrati nelle figure 6 e 7 per il rifiuto solido e il lisciviato, rispettivamente.



**Figura 6** - Organismi e saggi utilizzati per la caratterizzazione ecotossicologica delle ceneri (rifiuto solido) (sopra le colonne è riportato il numero di contributi scientifici).

Abbreviazioni: PT a/s: Piante Terrestri - test acuto/subcronico; Va: Vermi *E. fetida*, *E. andrei* - test acuto; Vat: Vermi *E. fetida*, *E. andrei* - Avoidance test; Vs: Vermi *E. fetida*, *E. andrei*, *E. albydus* - test subcronico; Cs: Collemboli *F. candida* - test subcronico; Ba: Batteri *A. olobiformis* - test acuto





**Figura 7 - Organismi e saggi utilizzati per la caratterizzazione ecotossicologica del lisciviato di ceneri (sopra le colonne è riportato il numero di contributi scientifici).**

Abbreviazioni: BB: Batteri bioluminescenti - test acuto; A: Alghe verdi monocellulari - test cronico; CrCl a: Crostacei Cladoceri - test acuto; CrCl c: Crostacei Cladoceri *C. dubia* - test cronico; CrCo a: Crostacei Copepodi *N. spinipes* - test acuto; Pc: Pesci *D. rerio* - test cronico; PA: Pesci *P. reticulata* - test acuto; B umu: Batteri *S. typhimurium* - umu test; B c: Batteri *P. putida* - test cronico; R c: Rotiferi *B. calyciflorus* - test cronico; PA c: Piante acquatiche *Lemna minor* - test cronico; An a: Anfibi *X. laevis* - test acuto; InV: metodi in vitro (saggi di citotossicità) con linee cellulari.

Negli studi (7/9) in cui le ceneri sono state caratterizzate come matrice solida, è sempre stato applicato il saggio con Piante terrestri (acuto, secondo ISO 11269 – 2 e subcronico secondo OECD GL n° 208). Le specie più utilizzate sono risultate: *Lactuca sativa* (6), *Brassica rapa* (5) e *Avena sativa* (4).

Per quanto riguarda le analisi ecotossicologiche su lisciviato, quasi tutti gli studi hanno utilizzato i saggi: acuto con batteri bioluminescenti (*V. fischeri*/*P. phosphoreum*), cronico con alghe verdi monocellulari (*Pseudokirchneriella subcapitata* o *Desmodesmus subspicatus*) e acuto con Crostacei Cladoceri (*Daphnia magna* o *Ceriodaphnia dubia*).

I criteri principali di selezione della batteria, da parte dei diversi Autori, sono stati quelli della rappresentatività di differenti livelli trofici, dell'uso di saggi convalidati e riconosciuti a livello internazionale e della rilevanza ecologica e sensibilità delle specie.

Solo in tre casi (Lapa et al., 2002; Römbke et al., 2009 e Koci et al., 2010) è stato utilizzato un criterio di classificazione finale di tossicità del rifiuto analizzato mediante batteria. I tre sistemi - Toxicity Classification System (TSC), Limit Dilution Value (LID) e Koci et al., 2010 - molto diversi tra loro, non consentono alcun tipo di confronto o valutazione complessiva. D'altra parte, nei diversi contributi viene spesso sottolineato che le metodologie adottate a livello comunitario sono molte e differenti, e necessitano di un ampio sforzo di armonizzazione, soprattutto nella prospettiva del recupero e riutilizzo dei rifiuti. Non è stato parimenti possibile effettuare un confronto tra le diverse scale di sensibilità degli organismi delle differenti batterie proposte dai vari Autori. L'unico dato riscontrato nella maggior parte degli studi è relativo all'elevata sensibilità del saggio subcronico diretto su matrice solida con le Piante e del saggio cronico indiretto sul lisciviato con Alghe. In generale, tuttavia, quando impiegati nella stessa batteria, i test cronici sono risultati più sensibili dei test acuti e il loro utilizzo viene pertanto fortemente raccomandato.

### Rifiuti provenienti da processi termici

In base all'Elenco Europeo, questa categoria di rifiuti è designata dal codice 10 "rifiuti prodotti da processi termici" che, negli studi da noi analizzati, ha compreso:

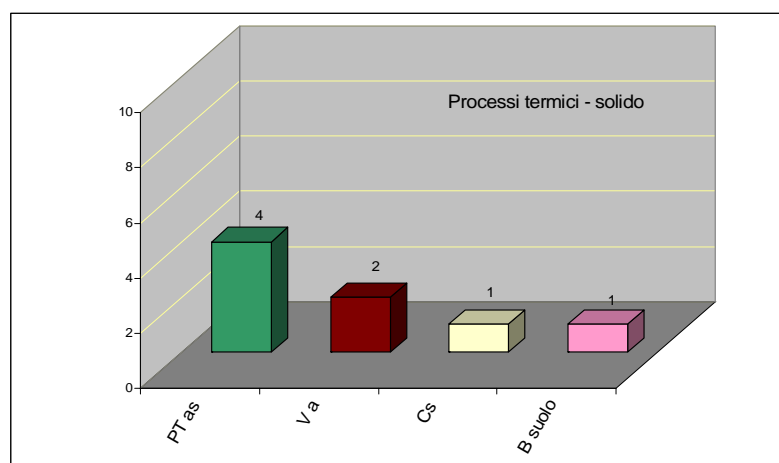
- rifiuti della metallurgia termica del piombo contenenti sostanze pericolose(10 04 01\*);
- rifiuti dell'industria del ferro e dell'acciaio:
  - o scorie di altoforno non trattate (10 02 02)
  - o rifiuti solidi prodotti dal trattamento dei fumi, contenenti sostanze pericolose (10 02 07\*);
  - o rifiuti prodotti dal trattamento dei fumi, diversi da quelli di cui alla voce precedente (10 02 08);

- rifiuti prodotti dal trattamento delle acque di raffreddamento, contenenti oli (10 02 11\*)
- rifiuti prodotti dal trattamento delle acque di raffreddamento, diversi da quelli della voce precedente (10 02 12)
- fanghi e residui di filtrazione prodotti dal trattamento dei fumi, contenenti sostanze pericolose (10 02 13\*)
- fanghi e residui di filtrazione prodotti dal trattamento dei fumi, diversi da quelli della voce precedente (10 02 14)
- rifiuti della fusione di materiali ferrosi
  - polveri di gas di combustione contenenti sostanze pericolose (10 09 09\*)
  - polveri di gas di combustione diverse da quelle della voce precedente (10 09 10)
- rifiuti della metallurgia termica dell'alluminio
  - polveri dei gas di combustione contenenti sostanze pericolose (10 03 19\*)
  - polveri dei gas di combustione diverse da quelle della voce precedente (10 03 20)
  - altre polveri e particolati (comprese quelle prodotte da mulini a palle), contenenti sostanze pericolose (10 03 21\*)
  - altre polveri e particolati (comprese quelle prodotte da mulini a palle), diverse da quelle della voce precedente (10 03 22)
  - rifiuti prodotti dal trattamento di scorie saline e scorie nere, contenenti sostanze pericolose (10 03 29\*)
  - rifiuti prodotti dal trattamento di scorie saline e scorie nere, diversi da quelli della voce precedente (10 03 30)
- Rifiuti prodotti da centrali termiche ed altri impianti termici, tranne 19 (ceneri leggere da combustione in impianti energetici e ceneri leggere da combustione di biomasse):
  - ceneri pesanti, scorie e polveri di caldaia prodotte da coincenerimento, contenenti sostanze pericolose (10 01 14\*)

Gli organismi e i relativi saggi utilizzati per la caratterizzazione ecotossicologica dei rifiuti provenienti da processi termici sono mostrati nelle figure 8 e 9 per la matrice solida e il lisciviato, rispettivamente.

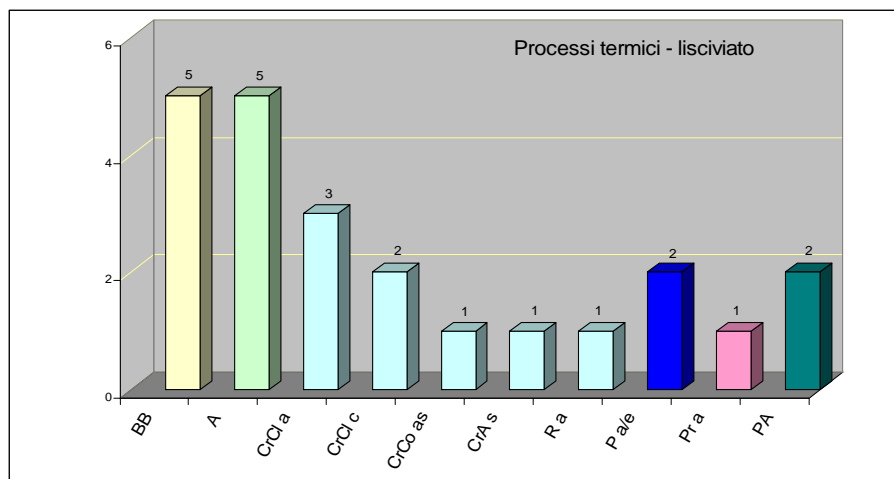
Nei quattro studi (Koči et al., 2010; Pandard et al., 2006; Ferrari and Ferard. 2005; Wilke et al., 2008 ) in cui questa tipologia di rifiuto è stata caratterizzata come matrice solida, è sempre stato applicato il saggio con Piante terrestri (acuto, secondo ISO 11269 – 2 e subcronico secondo OECD GL n° 208). La specie più utilizzata è risultata la *Lactuca sativa* (3).

Anche per questa tipologia di rifiuto i saggi maggiormente utilizzati sul lisciviato sono stati: acuto con batteri bioluminescenti (*V. fischeri*), cronico con alghe verdi monocellulari di diverse specie (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Desmodesmus subspicatus*, *Raphidocelis subcapitata*) e acuto con Crostacei Cladoceri (*Daphnia magna* o *Ceriodaphnia dubia*).



**Figura 8** - Organismi e saggi utilizzati per la caratterizzazione ecotossicologica dei processi termici (rifiuto solido). Sopra le colonne è riportato il numero di contributi scientifici.

Abbreviazioni: PT a/s: Piante Terrestri *L. sativa*, *B. rapa*, *S. alba*, *H. vulgare*, *T. aestivum* test acuto/subcronico; Va: Vermi *E. fetida*, *E. andrei* - test acuto; Cs: Collemboli *F. candida* - test subcronico; B suolo: batteri del suolo (curve di respirazione).



**Figura 9** - Organismi e saggi utilizzati per la caratterizzazione ecotossicologica del lisciviato di rifiuti da processi termici. Sopra le colonne è riportato il numero di contributi scientifici.

Abbreviazioni: BB: Batteri bioluminescenti - test acuto; A: Alghe verdi monocellulari - test cronico; CrCl a: Crostacei Cladoceri - test acuto; CrCl c: Crostacei Cladoceri *C. dubia* - test cronico; CrCo a: Crostacei Copepodi *N. spinipes* - test acuto/subcronico; CAs: Crostacei Anostraci *T. platyurus* - test subcronico Pa/e: Pesci *P. reticulata*, *D. rerio* - test acuto e di embriotossicità; R a: Rotiferi *B. calyciflorus* - test acuto; Pr a: Protozoi *S. ambiguum* - test acuto; PA: Piante acquatiche *Lemma minor*.

Solo in due studi (Wilke et al., 2008 e Koci et al., 2010) sono stati utilizzati dei criteri di classificazione finale di tossicità del rifiuto. Anche in questo caso, i due sistemi, Toxicity Classification System (TSC) e Koci et al., 2010, molto diversi tra loro, non consentono alcun tipo di confronto o valutazione complessiva. Tuttavia, all'interno del contributo di Wilke et al., 2008 è stato effettuato un confronto tra il sistema TSC e l'approccio SSD (Species Sensitivity Distribution) basato sul modello di estrapolazione DIBAEX (DIstribution BAseD EXtrapolation) di Wagner and Lokke, 1991. In generale, i modelli di estrapolazione *laboratory-to-field* utilizzano, per stimare gli effetti tossici degli inquinanti per un ecosistema, modelli di distribuzione dei dati di tossicità acuta o cronica, ottenuti mediante saggi di laboratorio su specie selezionate.

Nella procedura di estrapolazione DIBAEX si assume che i dati di tossicità (per singola specie e per tutte le specie di un ecosistema) siano variabili stocasticamente indipendenti con una distribuzione log-normale. Tale modello, applicabile sia ai valori di  $EC_{50}/LC_{50}$ , che ai valori di NOEC ottenuti su differenti organismi-test, permette di calcolare le Concentrazioni di Pericolosità ( $HC_p$ ), assumendo che a tali concentrazioni di composto tossico non più di un  $p$  percentuale di tutte le specie mostrerà un effetto dannoso pari:

- al 50% (se si utilizzano i dati di  $EC_{50}/LC_{50}$ )

- a una percentuale non significativamente differente dal controllo (se si utilizzano i valori di NOEC).

Il modello DIBAEX è stato frequentemente applicato nei Paesi del Nord Europa, per calcolare i criteri di qualità del suolo (Soil Quality Criteria, SQC).

Wilke et al., 2008 hanno calcolato, mediante il programma ETX-2.0 di Van Vlaardingen et al., 2004, i valori di  $HC_5$  dei rifiuti, utilizzando sia i valori di  $EC_{50}/LC_{50}$ , che i valori di NOEC ottenuti dai saggi ecotossicologici.

Messi a confronto, i sistemi TCS e SSD, non forniscono sempre risultati comparabili. Solo quando il modello SSD utilizza i valori di  $LC_{50}/EC_{50}$  si ottiene la stessa scala di ecotossicità del modello TCS. Al contrario, con i valori di NOEC i due sistemi non sono confrontabili. Questo è probabilmente dovuto alla maggiore dispersione dei valori di  $H_5$  ricavati dai dati di NOEC, che inoltre risultano anche influenzati dai valori delle diluizioni e da altre condizioni sperimentali che pesano sul potere discriminatorio del test statistico.

In ogni caso, tra i due, il sistema TCS presenta una maggiore sensibilità e ha permesso di attribuire ai rifiuti analizzati dagli Autori (ceneri pesanti e scorie da processi termici, fanghi da trattamento di rifiuti pericolosi, petrolio, eccetto i fanghi da trattamento di acque reflue urbane) la classe di tossicità 3 (elevata tossicità).

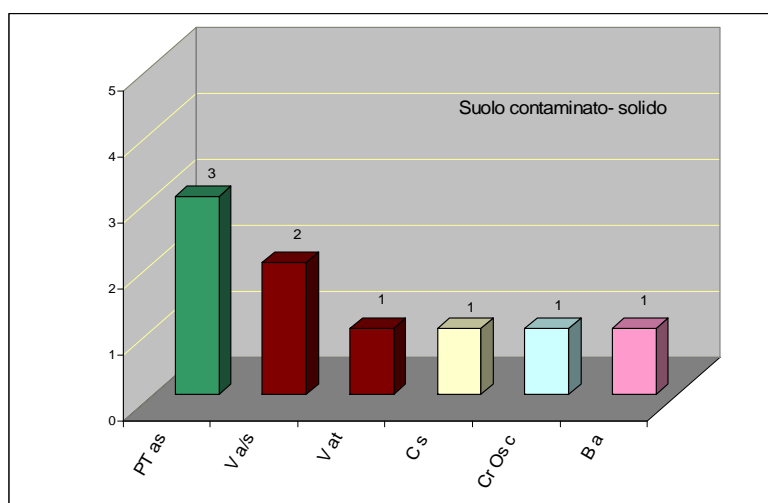
## Suolo contaminato

In base all'Elenco Europeo, questa categoria di rifiuti è designata dal codice 17 05 “rifiuti delle operazioni di costruzione e demolizione (compreso il terreno proveniente da siti contaminati – terra, rocce e fanghi di dragaggio” che, negli studi da noi analizzati, ha compreso:

- terra e rocce, contenenti sostanze pericolose (17 05 03\*)
- terra e rocce diverse da quelle di cui alla voce precedente (17 05 04)
- fanghi di dragaggio, contenenti sostanze pericolose (17 05 05\*)
- fanghi di dragaggio, diversi da quelli di cui alla voce precedente (17 05 06)

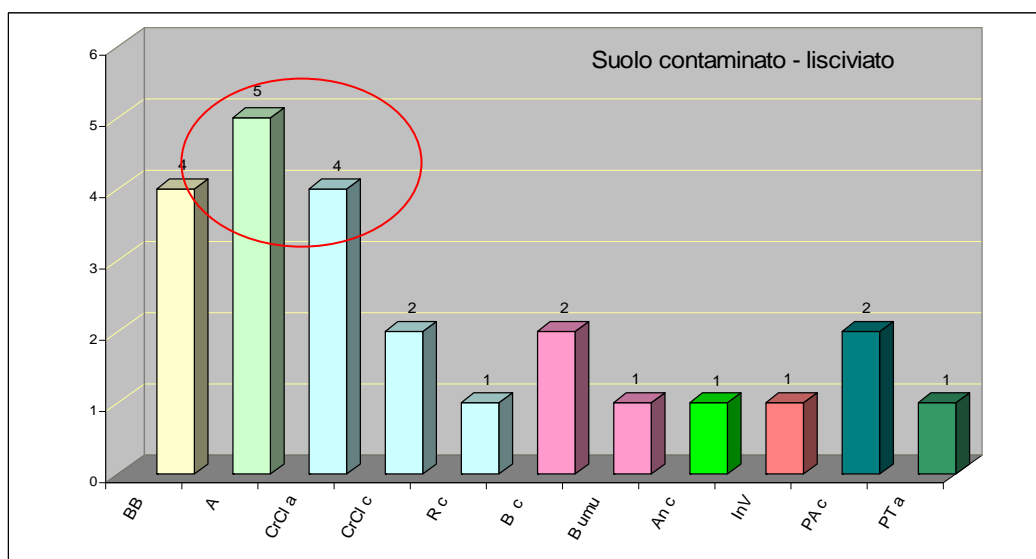
Gli organismi e i relativi saggi utilizzati per la caratterizzazione ecotossicologica dei suoli contaminati sono mostrati nelle figure 10 e 11 per la matrice solida e il lisciviato, rispettivamente.

Anche per questa tipologia di rifiuto i saggi maggiormente utilizzati sul lisciviato sono stati: acuto con batteri bioluminescenti (*V. fischeri*), cronico con alghe verdi monocellulari di diverse specie (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Desmodesmus subspicatus*, *Scenedesmus subspicatus*) e acuto con *Daphnia magna*.



**Figura 10** - Organismi e saggi utilizzati per la caratterizzazione ecotossicologica del suolo contaminato (rifiuto solido). Sopra le colonne è riportato il numero di contributi scientifici.

Abbreviazioni: PT a/s: Piante Terrestri *L. sativa*, *B. rapa*, *S. alba*, *H. vulgare*, *T. aestivum*, test acuto/subcronico; Va: Vermis *E. fetida* - test acuto; C s: Collemboli *F. candida* - test subcronico; Cr Os c: Crostacei Ostracodi *H. incongruens* - test cronico; B Batteri *A. globiformis* - test acuto



**Figura 11** - Organismi e saggi utilizzati per la caratterizzazione ecotossicologica del lisciviato di suolo contaminato. Sopra le colonne è riportato il numero di contributi scientifici.

Abbreviazioni: BB: Batteri bioluminescenti *V. fischeri* - test acuto; A: Alghe verdi monocellulari - test cronico; CrCl a: Crostacei Cladoceri *D. magna* - test acuto; CrCl c: Crostacei Cladoceri *C. dubia* - test cronico; R c: Rotiferi *B. calyciflorus* - test cronico; B c: Batteri *P. putida* - test cronico; B umu: Batteri *S. typhimurium* - umu test; An a: Anfibi *X. laevis* - test acuto; InV: metodi in vitro (saggi di citotossicità) con linee cellulari (RTG-2 e H4IIE); PA: Piante acquatiche *Lemna minor* - test cronico; PT a *Synopsis alba* - test acuto.

---

Per quanto riguarda alcuni saggi non tradizionali applicati a questa tipologia di rifiuto, si evidenzia quanto segue:

- il saggio di valutazione della mortalità larvale con l'anfibio *Xenopus laevis* (Pablos et al., 2009) applicato al lisciviato di rifiuto, ed eseguito secondo un metodo non ancora normato, sebbene presenti una buona sensibilità (positività nel 60% dei campioni), si è dimostrato comunque meno sensibile del saggio acuto tradizionale con *Daphnia magna* (positività nell'80% dei campioni).
- due dei saggi di citossicità *in vitro* utilizzati da Pablos et al., 2009 - il Neutral Red Assay e DR CALUX test - con linee cellulari di pesce (RTG-2) e di mammifero (H4IIE), hanno mostrato una capacità di rilevare la tossicità confrontabile con quella del saggio *in vivo* con *Xenopus laevis*, pertanto potrebbero essere inseriti, secondo gli Autori, nelle batterie di saggi per la valutazione di ecotossicità dei rifiuti. La minore sensibilità dei saggi di citotossicità, pur costituendo ancora il limite maggiore ad una loro più vasta applicazione, può comunque essere migliorata attraverso la sostituzione/riduzione della percentuale di siero fetale bovino addizionato al terreno di crescita (Schirmer, 1997; Schirmer et al., 2004; Hestermann et al., 2000), la selezione di endpoint citotossici appropriati (Schirmer et al., 1998; Davoren et al., 2005; Jos et al., 2009) e l'utilizzo di sistemi cellulari che riflettano la diversità funzionale e la complessità dei siti bersaglio presenti in un organismo in vivo (ad esempio le linee cellulari continue che conservano alcune delle funzioni del tessuto da cui sono originate, come la linea RTL-W1 di trota, originata dal fegato, capace di bioattivare molti importanti composti chimici tossici) (Knauer et al., 2007; Kramer et al., 2009). La misura della concentrazione epatica di metalli pesanti nel pesce *Oreochromis mossambicus* (Wang et al., 2009) per il quale il sedimento costituisce parte della sua dieta, è risultata altamente sensibile nel determinare la tossicità dovuta ai metalli pesanti nel rifiuto solido.

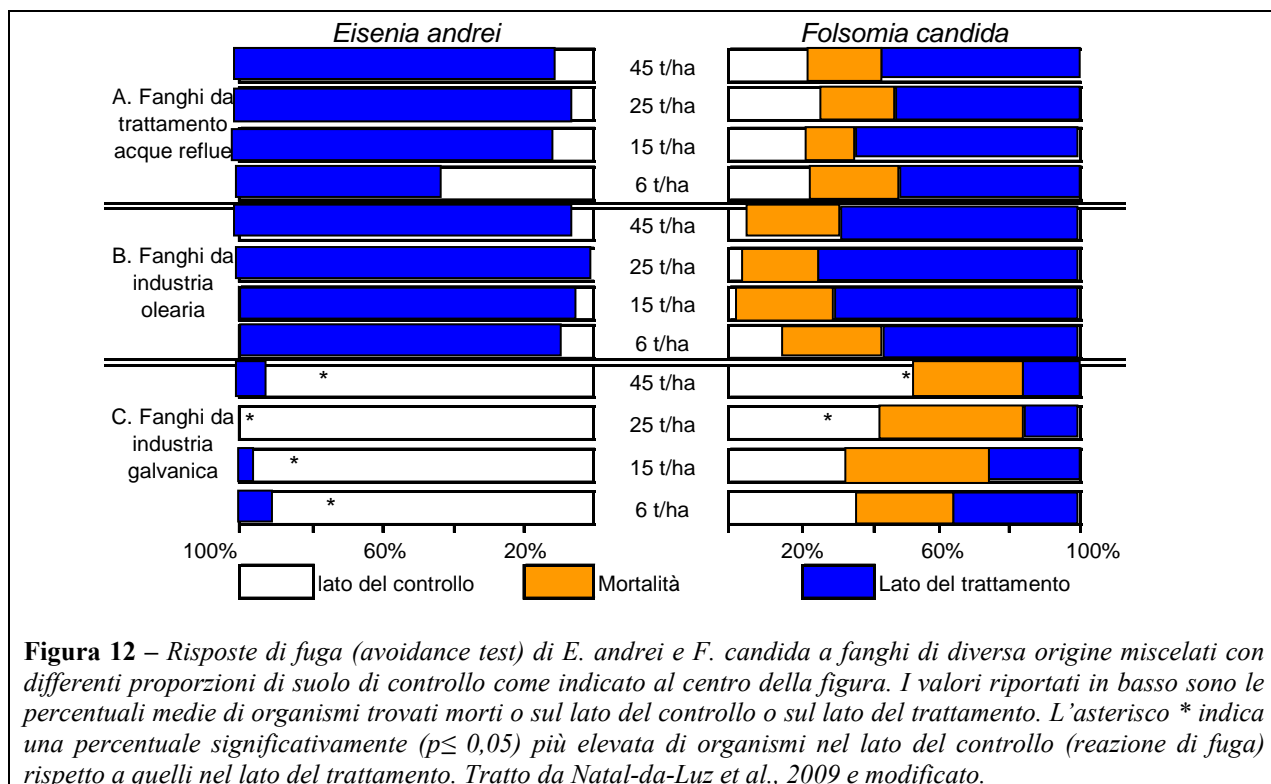
#### 4.4 Fanghi

In questo gruppo sono compresi gli studi che hanno riguardato le seguenti categorie di rifiuto:

- fanghi prodotti da operazioni di lavaggio, pulizia, sbucciatura, centrifugazione e separazione di componenti (02 03 01)
- rifiuti prodotti dall'estrazione tramite solvente (02 01 03)
- rifiuti prodotti dal trattamento e ricopertura di metalli (ad esempio, processi galvanici, zincatura, decappaggio, pulitura elettrolitica, fosfatazione, sgrassaggio con alcali, anodizzazione) (11 01 XX)
- fanghi prodotti dal trattamento di acque reflue urbane (19 08 05)
- fanghi prodotti dal trattamento biologico delle acque reflue industriali, contenenti sostanze pericolose (11 08 11\*)
- fanghi prodotti dal trattamento biologico delle acque reflue industriali, diversi da quelli di cui alla voce precedente (11 08 12)
- fanghi contenenti sostanze pericolose prodotti da altri trattamenti delle acque reflue industriali (11 08 13\*)
- fanghi prodotti da altri trattamenti delle acque reflue industriali, diversi da quelli di cui alla voce precedente (11 08 14)

Data l'esiguità e l'estrema eterogeneità dei contributi bibliografici non è possibile effettuare una comparazione tra di essi. Merita tuttavia di essere menzionata l'applicazione del test di fuga (Avoidance Test) con i vermi della specie *Eisenia andrei* e i Collemboli della specie *Folsomia candida* (Natal-da-Luz et al., 2009). Questo tipo di saggio, sebbene venga influenzato dal contenuto di materia organica del campione (gli organismi sono maggiormente attratti da suoli ad elevato contenuto di materia organica), si è dimostrato tuttavia idoneo per la valutazione ecotossicologica di fanghi di diversa origine.

Nella figura 12 sono mostrati i risultati del saggio di fuga eseguito da Natal-da-Luz et al., 2009. Nel caso di *Eisenia*, non si osserva mai mortalità durante il saggio e solo i campioni di fanghi da industria galvanica (campioni C) hanno dato una risposta di fuga significativa per tutte le miscele (LOEC = 6 t/ha; EC<sub>50</sub> = 0,4 t/ha). Anche nel caso dei Collemboli, i fanghi C sono risultati più tossici inducendo una mortalità del 37,75% (fanghi A = 22,25%; fanghi B = 26,5%). La risposta di fuga degli organismi è risultata significativa nelle miscele di 45 e 25 t/ha dei fanghi C (LOEC = 15 t/ha).



I risultati ottenuti nell'Avoidance test risultano comparabili a quelli ottenuti nei saggi di valutazione della riproduzione (56 giorni di esposizione) e della crescita (28 giorni di esposizione), come mostrato in tabella 25. In tutti i saggi i campioni A e B non sono risultati tossici.

**Tabella 25 – Valutazione della tossicità dei fanghi provenienti da industria galvanica (campioni C). Tratto da Natal-da-Luz et al., 2009 e modificato**

Campioni	Specie	End point	Esposizione (gg)	NOEC (t/ha)	LOEC (t/ha)	EC20 (t/ha)	EC50 (t/ha)
C	<i>E.andrei</i>	Crescita adulti	28	6	15	4,0 (2,4 - 5,5)	9,9 (5,9 - 13,9)
		Riproduzione	56	6	15	7,7 (2,8 - 12,7)	11,6 (7,4 - 15,8)
		Fuga	7	<6	6	0,02	0,4
	<i>F.candida</i>	Crescita adulti	28	Non si evidenzia tossicità			
		Riproduzione	56	Non si evidenzia tossicità			
		Fuga	7	15	25	-	-

### *Petrolio, rifiuti della raffinazione del petrolio e prodotti energetici. Solventi organici, oli esauriti e residui di combustibili liquidi*

In questo gruppo sono compresi gli studi che hanno riguardato le seguenti categorie di rifiuto:

- rifiuti della raffinazione del petrolio, purificazione del gas naturale e trattamento pirolitico del carbone (05 XX XX);
- rifiuti della raffinazione del petrolio: morchie depositate sul fondo dei serbatoi (05 01 03\*)
- petrolio (13 07 02\*)
- solventi organici, refrigeranti e propellenti di scarto (14 XX XX)

Data l'esiguità e l'estrema eterogeneità dei contributi bibliografici non è possibile effettuare una comparazione tra di essi, tuttavia, merita di essere sottolineata l'applicazione del RET (Reverse Electron Transport) assay, eseguito con particelle submitocondriali preparate da mitocondri di cuore di bovino. Questo metodo utilizza una reazione enzimatica mitocondriale, la riduzione del NAD a NADH, per rilevare la tossicità delle sostanze inquinanti, come tali o presenti in una matrice acquosa. Il saggio,

---

impiegato nell'ampia batteria (11 organismi) di Juvonen et al. 2000, è risultato il più sensibile per la valutazione di ecotossicità del lisciviato di rifiuto proveniente dai processi di raffinazione del petrolio. Il RET assay viene da lungo tempo ritenuto una valida alternativa al Microtox con *Vibrio fischeri* per lo screening dei composti chimici idrosolubili. La sensibilità del metodo mitocondriale è stata comparata con le sensibilità di altri metodi di valutazione della tossicità sia *in vivo* che *in vitro* pubblicate da diversi Autori (Weideborg et al., 1997). L'analisi di regressione dei valori di tossicità per 42 composti chimici (pesticidi, metalli, alcoli, inibitori della respirazione, fenoli e ftaleni) indica una correlazione molto buona tra la sensibilità del saggio mitocondriale e la sensibilità di altri saggi di citotossicità eseguiti con sistemi cellulari di mammifero ( $r^2=0.86$ ). Anche i dati ottenuti dai test di tossicità condotti *in vivo* su pesci sono risultati ben correlati con il RET assay ( $r^2=0.79$ ). Infine, la rapidità (tempo di esecuzione: 20 minuti) ed economicità del test, lo rendono quindi molto interessante anche per un'applicazione nell'ambito delle batterie sui rifiuti.

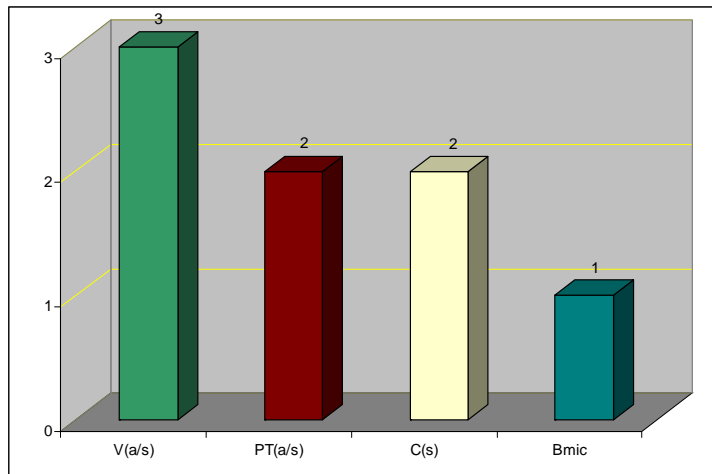
#### 4.6 Rifiuti prodotti da impianti di trattamento dei rifiuti e impianti di trattamento delle acque reflue.

In base all'Elenco Europeo i rifiuti prodotti da impianti dedicati al trattamento primario od intermedio dei rifiuti appartengono alla macrocategoria designata dal codice 19. Si tratta di una categoria molto ampia e alquanto varia, trattandosi di rifiuti originati da processi molto diversi tra loro e la cui composizione è estremamente eterogenea. Molti di essi sono classificati con voci specchio (*mirror entries*).

I rifiuti sottoposti a saggi ecotossicologici negli studi da noi selezionati sono:

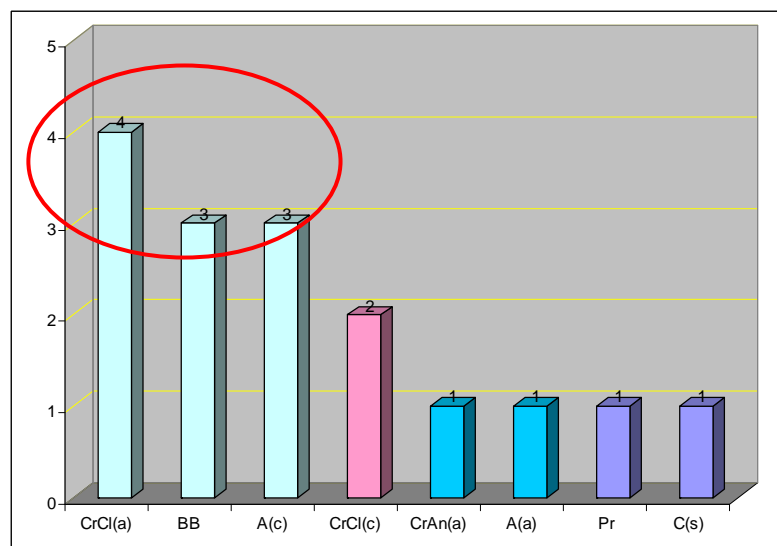
- rifiuti prodotti dal trattamento aerobico di rifiuti solidi:
  - Parte di rifiuti animali e vegetali non compostata (19 05 02)
  - Rifiuti non specificati altrimenti (19 05 99)
- Rifiuti prodotti dal trattamento anaerobico dei rifiuti:
  - Rifiuti non specificati altrimenti (19 06 99)
- Rifiuti prodotti dal trattamento meccanico dei rifiuti (ad esempio selezione, triturazione, compattazione, riduzione in pellet) non specificati altrimenti:
  - Altri rifiuti (compresi materiali misti) prodotti dal trattamento meccanico dei rifiuti, contenenti sostanze pericolose (19 12 11\*)
  - Altri rifiuti (compresi materiali misti) prodotti dal trattamento meccanico dei rifiuti diversi da quelli di cui alla voce 19 12 11(19 12 12)
- Rifiuti prodotti dagli impianti per il trattamento delle acque reflue, non specificati altrimenti (19 08 XX).
- Rifiuti prodotti da specifici trattamenti chimico-fisici di rifiuti industriali:
  - Fanghi prodotti da trattamenti chimico-fisici, contenenti sostanze pericolose (19 02 05\*);
  - Fanghi prodotti da trattamenti chimico-fisici, diversi da quelli di cui alla voce precedente (19 02 06)

Gli organismi e i relativi saggi utilizzati per la caratterizzazione ecotossicologica di questa tipologia di rifiuto, sono mostrati nelle figure 13 e 14 per la matrice solida e il lisciviato, rispettivamente.



**Figura 13** - Organismi e saggi utilizzati per la caratterizzazione ecotossicologica (su solido) di rifiuti prodotti da impianti di trattamento dei rifiuti e impianti di trattamento delle acque reflue (sopra le colonne è riportato il numero di contributi scientifici)

Abbreviazioni: PT a/s: Piante Terrestri - *Lactuca sativa* - test acuto; *Brassica rapa*, *Lolium perenne*, *Trifolium pratense* - test subcronico; V(a/s): Vermi - *Eisenia fetida*, - test acuto; V(s): Vermi - *Enchytraeus crypticus*, *Eisenia andrei* - test subcronico; C(s): Collemboli - *Folsomia candida* - test subcronico; Bmic: Biomassa microbica del suolo (SIR, substrate-induced respiration, OECD LG 217).



**Figura 14** - Organismi e saggi utilizzati per la caratterizzazione ecotossicologica del lisciviato da rifiuti prodotti da impianti di trattamento dei rifiuti e impianti di trattamento delle acque reflue (sopra le colonne è riportato il numero di contributi scientifici)

Abbreviazioni: BB: Batteri bioluminescenti, *Vibrio fischeri* - test acuto; A: Alghe verdi monocellulari, *Pseudokirchneriella subcapitata* - test cronico; CrCl(a): Crostacei Cladoceri, *Daphnia magna* - test acuto; CrCl(c) Crostacei Cladoceri, *Ceriodaphnia dubia* - test cronico; CrAn(a): Crostacei Anostraci, *Thamnocephalus platyurus* - test acuto; P: Protozoi, *Tetrahymena thermophila* - test acuto. C(s): Collemboli, *Folsomia candida* - test subcronico

Per quanto riguarda i criteri di scelta delle batterie di saggi, la rappresentatività di organismi appartenenti a differenti livelli trofici e la fattibilità tecnico-economica dei saggi (ad esempio utilizzo di microbiotest), sono i due aspetti verso cui i diversi Autori hanno posto particolare attenzione.

Relativamente al lisciviato, i saggi maggiormente utilizzati sono risultati quelli acuti con il batterio *Vibrio fischeri* e il crostaceo *Daphnia magna* e quello cronico con l'alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Per quanto riguarda i saggi su matrice solida, sono stati effettuati quasi esclusivamente saggi cronici e subcronici.

Negli studi considerati, alcuni Autori esprimono numerose riserve relativamente alla capacità dei saggi su lisciviato di rappresentare adeguatamente la tossicità della matrice suolo (Domene et al., 2007, Pandard et al., 2006, Crouau et al., 2002, Renoux et al., 2001, Robidoux et al., 1998, Krogh and Pedersen, 1997, Krogh



et al., 1997). I saggi su lisciviato, infatti, sono in grado di rilevare la potenziale tossicità per i suoli per gli elementi immediatamente disponibili, ma la biodisponibilità a lungo termine può essere misurata solo con test cronici effettuati direttamente su matrice solida (Mc Millen et al., 2003; Alexander et al., 2003).

Lo studio di Manusadzianas et al., 2003 merita particolare attenzione per due aspetti: il primo e più importante, è l'utilizzo di una batteria composta esclusivamente da Microbiotest; il secondo aspetto riguarda il tentativo di correlare alcuni indici di tossicità ecotossicologici con gli indici chimici cumulativi. Questi ultimi, sono ottenuti comparando i dati chimici con i valori di MAC (Maximum Allowable Concentration) dei contaminanti più importanti.

Relativamente al primo aspetto, vengono riportate dagli Autori, due scale di sensibilità: una di tipo di tipo "quantitativo", che esprime la capacità dei saggi di fornire una misura della tossicità rilevata, e una di tipo "qualitativo", che tiene conto solo della capacità del saggio di rilevare la tossicità. La scala di sensibilità di tipo quantitativo è risultata essere la seguente: Charatox (saggio acuto a 45 minuti con *Nitellopsis obtusa*) ≥ Thamnotoxkit (saggio acuto a 24 ore *Thamnocephalus platyurus*) > Protoxkit (saggio cronico con a 24 ore con *Tetrahynema thermofila*) ≈ Microtox (saggio acuto a 30 minuti con *Vibrio fischeri*) ≈ Daphtoxkit (saggio acuto a 24-48 ore con *Daphnia magna*) > Algaltoxkit (saggio cronico di inibizione della crescita a 72 ore con *Selenastrum capricornutum*).

La scala di sensibilità "qualitativa" è risultata essere la seguente: Charatox (saggio acuto a 45 minuti con *Nitellopsis obtusa*) > Thamnotoxkit (saggio acuto a 24 ore *Thamnocephalus platyurus*) > Microtox (saggio acuto a 30 minuti con *Vibrio fischeri*) > Daphtoxkit (saggio acuto a 24-48 ore con *Daphnia magna*) ≈ Protoxkit (saggio cronico con a 24 ore con *Tetrahynema thermofila*) > Algaltoxkit (saggio cronico di inibizione della crescita a 72 ore con *Selenastrum capricornutum*).

In entrambi i casi, emerge che i saggi Charatox con l'alga *N. obtusa* e Thamnotoxkit con *T. platyurus* presentano la sensibilità relativa maggiore ed esprimono una ottima capacità di discriminazione tra campioni. Inoltre, si evidenzia che le due specie algali utilizzate, *N. obtusa* e *S. capricornutum*, presentano una risposta completamente diversa. Infatti, il test acuto di valutazione della depolarizzazione della membrana, Charatox, è risultato molto sensibile con una capacità di rilevare la tossicità (Toxicity Detection Capacity, TDC) nel 90% dei campioni analizzati (TDC = 90%), mentre il saggio cronico, Algaltoxkit è risultato il meno sensibile avendo registrato valori di TDC pari al 20%.

Sulla base di questi risultati e attraverso l'applicazione dell'analisi statistica multivariata PCA, gli Autori definiscono quindi una batteria minima per lo screening preliminare degli effluenti, composta da solo tre saggi: Charatox, Thamnotoxkit e Microtox.

Lo studio di Manusadzianas et al., 2003, è interessante inoltre, perchè la batteria di Microbiotest viene valutata mediante 4 diversi indici di tossicità:

- 1) Indice di tossicità media (AvTx) dato dalla somma dei valori degli *endpoint* espressi in Unità Tossiche (UT = 1/E-LC<sub>50</sub>) diviso il numero dei test.
- 2) Indice di impronta tossica (TxPr) ottenuto moltiplicando il valore di AvTx per il numero di test con risposta positiva.
- 3) Indice PEEP (Costan et al., 1993, vedi tabella 5 del presente lavoro) secondo la formula: PEEP = log<sub>10</sub> [1+ (TxPr)].
- 4) Indice MST (Most Sensitive Test) che si basa sul più alto valore di UT ottenuto tra i vari test utilizzati (ipotesi conservativa).

Nella tabella 25 è mostrata la classificazione dei 21 campioni di effluenti urbani e industriali mediante tre dei quattro indici di valutazione della tossicità utilizzati.

**Tabella 25** – Classificazione dei 21 campioni di effluenti mediante tre indici di valutazione della tossicità. Tratto da Manudzianas et al., 2003 e modificato.

Indice	Numero di campioni nelle diverse classi di tossicità				
	Non tossico	Lievemente tossico	Tossico	Molto tossico	Estremamente tossico
AVTx	2	6	9	4	0
TxPr	2	3	9	4	3
MST	2	2	7	8	2

La scala di classificazione è tratta da Persoone et al., 1993. Non tossico: UT= 0; lievemente tossico: UT<1; tossico: UT= 1-10; molto tossico: UT= 11-100; estremamente tossico: UT > 100.

La comparazione tra i diversi indici di tossicità e gli indici chimici mette in evidenza che la migliore correlazione tra le valutazioni ecotossicologiche e quelle chimiche si ottiene quando l'informazione non deriva da un solo test - il più sensibile - ma da tutti i test utilizzati nella batteria.

---

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Ahlf W, and Heise S, 2005. Sediment toxicity assessment. Rationale for effect classes. *Journal of Soils and Sediments* 5: 16-20.
- Aldenberg T, Jaworska JS, 2000. Uncertainty of the hazardous concentration and fraction affected for normal species sensitivity distributions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46: 1-8
- Alexander M, Cunningham SD, Chaney RR, Hughes JB, Harmsen J, 2003. Chemical measures of bioavailability. In Lanno R. (Ed.). *Contaminated Soil: From Soil-Chemical Interactions to Ecosystem Management*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). SETAC Press. Pensacola. FL. USA
- ANPA, 2001. Elementi per la caratterizzazione fisico-chimica, biologica ed ecotossicologica dei parametri addizionali (D.lgs 152/99) nella matrice acquosa, nel sedimento e nel biota. RTI CTN\_AIM 4./2001.
- Babín MM, Tarazona JV, 2005. In vitro toxicity of selected pesticides on RTG-2 and RTL-W1 fish cell lines. *Environmental Pollution* 135: 267-274.
- Balzamo S, Finocchiaro G, Frizza C, Conti D, Martone C, Cadoni F, 2010. Proposta di una batteria minima di biosaggi per valutazioni di ecotossicità ambientale mediante analisi statistica multivariata. Comunicazione orale presentata al Convegno: “Ricerca e applicazione delle metodologie ecotossicologiche in ambienti acquatici”. Giornate di studio 20-22 ottobre 2010. Livorno.
- Baudo R, Mountau H, 1985. Riflessioni sulle “aree problematiche” in ecotossicologia. *Acqua & Aria* 4: 331-339
- Baudo R, Faimali M, Onorati F, Pellegrini D, 2011 Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti di acque salate e salmastre. ISPRA Manuali e Linee Guida – serie I Manuali di Ecotossicologia 67/2011.
- Becker R, Kalbe U, and Bucholz A, 2009. Selection and characterization of test samples and eluates. In: Moser H, and Römbke J. *Ecotoxicological characterization of waste. Results and experiences of an international ring test*. Ed. Springer pp 35-46.
- Bernard C, Janssen CR, and Le Du-Delepierre A, 1997. Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates. *Chemosphere* 35: 2783-2796.
- Bierkens J., Klein G., Corbisier P., Van Den Heuvel R., Verschaeve L., Weltens R., Schoeters G. 1998 Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere*. Vol.37: 2935-2947.
- Blaise C, Leagult N, Bermingham N, Van Coillie R, and Vasseur P, 1986. A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment. *Toxicity Assessment* 1: 261-281.
- Blaise C, Forghani R, Legault R, Guzzo J, Dubow MS, 1994. A bacterial toxicity assay performed with microplates, microluminometry and Microtox reagent. *BioTechniques* 16: 932-937.
- Bombardier M, Bermingham N, 1999. The SED-TOX index: toxicity –directed management tool to assess and rank sediments based on their hazard. Concept and application. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 685-698.
- Borenfreund E, Puerner JA, 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters* 24: 119-124.
- Boronat S, Casado S, Navas JM, Pina B, 2007. Modulation of aryl hydrocarbon receptor transactivation by carbaryl, a non conventional ligand. *FEBS Journal* 274: 3327-3339.

- 
- Breitholtz M, Bengtsson B-E, 2001. Oestrogens have no hormonal effect on the development and reproduction of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*. *Marine Pollution Bulletin* 42: 879-886.
- Breitholtz M, Wollenberger L, 2003. Effects of three PBDEs on development reproduction and population growth rate of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*. *Aquatic Toxicology* 64: 85-96.
- Breitholtz M, Ricklund N, Bengtsson B-E, Persson J-N, 2007. Silica gel as a particulate carrier of poorly water-soluble substances in aquatic toxicity testing. *Aquatic Toxicology* 84: 251-264.
- Bulich AA, 1979. Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments. *Aquatic Toxicology* 667: 98-106.
- Cairns J, Niederlehner BR, 1995. Predictive ecotoxicology. In Casarett L and Doull'S J (Eds). *Toxicology*. Mc-Graw-Hill, New York, USA: 13-33.
- Centeno MDF, Persoone G, and Goyvaerts MP, 1995. Cyst-based toxicity tests IX. The potential of *Thamnocephalus platyurus* as test species in comparison with *Streptocephalus proboscideus* (Crustacea: Brachiopoda, Anostraca). *Environmental Toxicology and Water Quality* 10: 275-282.
- Chao M-R, and Chen C-Y, 2000. No observed effect concentrations in batch and continuous algal toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1589-1596.
- Clément B and Bouvet Y, 1993. Assessment of landfill leachate toxicity using the duckweed *Lemna minor*. Proceedings 2<sup>nd</sup> European Conference Ecotoxicology, Amsterdam (The Netherland), 1992, May 11-15. *Science and Total Environment*: 1179-1190
- Clément B and Merlin G, 1995. The contribution of ammonia and alkalinity to landfill leachate toxicity to duckweed. *Science and Total Environment* 170: 71-79.
- Costan G, Bermingham N, Blaise C, Ferard JF, 1993. Potential Ecotoxic Effects Probe (PEEP): a novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents. *Environmental Toxicology and Water Quality* 8 (2): 115-140.
- Crouau Y, Giseler C, Perotti P, 2002. The use of *Folsomia candida* (Collemboli, Isotomidae) in bioassay of waste. *Applied Soil Ecology* 19: 63-70.
- Dell'Orto N, Ciccotelli M, Cantelli D, Camantini M, 1997. Sviluppo di un sistema di biomonitoraggio a tre componenti per la valutazione della qualità delle acque. *Acqua & Aria* 5: 103-107.
- Davoren M, Ní Shuilleabháin S, Hartl MGJ, Sheehan D, O'Brien NM, O'Halloran J, Van Pelt ENAM, Mothersill C, 2005. Assessing the potential of fish cell lines as tools for the cytotoxicity testing of estuarine sediment aqueous elutriates. *Toxicology in vitro* 19: 421-431.
- Domene X, Alcaniz JM, Andrés P, 2007. Ecotoxicity assesment of organic waste using the soil collembolan *Folsomia candida*. *Applied Soil Ecology* 35: 461-472.
- Domene X, Alcañiz JM, Pilar A, 2008a. Comparison of solid-phase and eluate assay to gauge the ecotoxicological risk of organic waste on soil organism. *Environmental Pollution* 151: 549-558
- Domene X, Ramírez W, Mattana S, Alcañiz JM, Pilar A, 2008b. Ecological risk assessment of organic waste amendments using the species sensitivity distribution from a soil organics test battery *Environmental Pollution* 155: 227-236
- Donnevert G, Uhling S, and Moser T, 2009. Ring test data evaluation. In: Moser H, and Römbke J. Ecotoxicological characterization of waste. Results and experiences of an international ring test. Ed. Springer pp 47-60.

---

Dott W, van Afferden M, Ahlf W, Crösmann G, Daci B, Dorgerloh M, et al. 1995. DECHEMA-Ad-hoc-committee *Methods for Toxicological/Ecotoxicological Assessment of Soils*. DECHEMA Frankfurt/Main, Germany.

Ducrot V, Usseglio-Polatera P, Pery ARR, Mouton J, Lafont M, Roger M-C, Garric J, Ferard J-F, 2005. Using aquatic macroinvertebrate species traits to build test batteries for sediment toxicity assessment: Accounting for the diversity of potential biological responses to toxicants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (9): 2306-2315.

Durhan EJ, Norberg-King TJ, Mount DI, Burkhard LP, 1993. Methods for aquatic toxicity identification evaluations: phase II toxicity identification procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity. EPA/ 600/R-92/080. US Environmental Protection Agency, Duluth, MN, USA.

ECETOC (1993) Aquatic toxicity data evaluation. ECETOC: 64 pp.

Environment Canada, 2005. "Guidance Document on Statistical for Environmental Toxicity Tests. EPS1/RM/46 March 2005 (with 2007 amendments).

Environment Canada, 1993. Evaluation of the PEEP index and recommended toxicity tests for the Fraser River Basin. DOE FRAP 1993-09: 59.

Ferrari B, Féraud JF, 1996. Effects of nutritional renewal frequency on survival and reproduction of *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 765-770.

Ferrari B, Radetski MC, Veber AM, and Ferard JF, 1999. Ecotoxicological assessment of solid wastes: a combined liquid- and solid-phase testing approach using a battery of bioassays and biomarkers. *Environmental toxicology and Chemistry* 18: 1195-1202.

Ferrari B, and Ferard JF, 2005. Use of a battery of bioassays to classify hazardous wastes and evaluate their impact in the aquatic environment. *NEAR Curriculum in Natural Environmental Science, Terre et Environnement* 50: 1-26

Filipic M, 1995 Mutagenicity and toxicity of water extracts from Sora river are. *Mutation Research* 342: 1-8.

Fiskesjö G, 1997. The allium test for screening chemicals. In *Plants for environmental studies* (W. Wang, Gorsuch JW, and Hughes JS, Eds) pp. 302-331. Lewis, New York.

Gamst J, Kjeldsen P, Christensen TH, 2007. Determination of solute organic concentration in contaminated soils using a chemical-equilibrium soil column system. *Water, Air and Soil pollution* 183: 377-389.

Hartwell SI, 1997. Demonstration of a toxicological risk ranking method to correlate measures of ambient toxicity and fish community diversity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 361-371.

Hestermann EV, Stegemann JJ, Hahn ME, 2000. Serum alters the uptake and relative potencies of halogenated aromatic hydrocarbons in cell culture bioassays. *Toxicology Science* 53: 316-325.

Isidori M, Lavorgna M, Nardelli A, Parrella A, 2003. Toxicity identification evaluation of leachates from municipal solid waste landfills: a multispecies approach. *Chemosphere* 52: 85-94

Lapa N, Barbosa R, Morai J, Mendes B, Méhu J, Santos Oliveira JF, 2002. Ecotoxicological assesment of leachates from MSWI bottom ashes. *Waste Management* 22: 583-593.

Lukavský J, 1992. The evaluation of algal growth potential (AGP) and toxicity of water by miniaturized growth bioassay. *Water Research* 26: 1409-1413.

- 
- Jansch S, Rombke J, Schallnab H-J, Terytze K, 2006. Derivation of soil values for the path, soil-soil organisms for metals and selected organic compounds using species sensitivity distributions. *Environmental Science and Pollution Research* 14: 308-318.
- Jos A. et al., 2009. Aquatic toxicity assessment of the additive 6-methylcoumarine using four experimental systems. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 52-59.
- Kalsch W, Junker T, and Römbke J, 2006. Modifications of a chronic plant test for the assessment of contaminated soils. Part II: testing of contaminated soils. *Journal of Soils and Sediments* 6: 92-101.
- Knobeloch L, Blondin G, and Harkin J, 1994. A rapid bioassay for toxicity assessment of chemicals: reverse electron transport assay. *Environmental Toxicology and Water Quality* 9: 231-234.
- Koči V, Mocová K, Kulovaná M, Vosáhlová S, 2010. Phytotoxicity tests of solid wastes and contaminated soils in the Czech Republic. *Environmental Science and Pollution Research* 17: 611-623.
- Kong KY, Cheung KC, Wong CKC, Wong MH, 2005. The residual dynamic of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in fishponds of the Pearl River delta, South China. *Water Research* 39: 1831-1843.
- Kramer NI, Hermens JLM, Schirmer K, 2009. The influence of modes of action and physicochemical properties of chemicals on the correlation between *in vitro* and acute fish toxicity data. *Toxicology in vitro* 23: 1372-1379.
- Krogh PH, Holmstrup M, Jensen J, Petersen SO, 1997. Ecotoxicological assessment of sewage sludge in agricultural soil. Ministry of Environment and Energy, Danish Environmental Protection Agency. Working Report n. 69.
- Krogh PH, Pedersen MB, 1997. Ecological effects assessment of industrial sludge for microarthropods and decomposition in a spruce plantation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 36: 162-168
- Maxam G, Rila JP, Dott W, and Eisentraeger A, 2000. Use of bioassays for assesment of water-extractable ecotoxic potential of soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45: 240-246
- McMillen SJ, van Gestel CAM, Lanno RP, Linder GL, Pauwels SJ, Stephenson GL, 2003. Biological measures of bioavailability. In Lanno R. (Ed.). *Contaminated Soil: From Soil-Chemical Interactions to Ecosystem Management*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). SETAC Press. Pensacola. FL. USA
- Moser H, and Römbke J, 2009. Ecotoxicological characterization of waste. Results and experiences of an international ring test. Ed. Springer.
- Moser H, Röembke J, Donnevert G, and Becker R, 2011. Evaluation of biological methods for a future methodological implementation of the Hazard criterion H14 “ecotoxic“ in the European waste list (2000/532/CE). *Waste Management & Research* 29: 180-187
- Mount DI, Norberg Tj, 1984. A seven-day life-cycle Cladoceran test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 3: 425-434.
- Mount DI, 1989. Methods for aquatic toxicity identification evaluations: phase III toxicity confirmations procedures. EPA/600/3-88/036. US Environmental Protection Agency, Duluth, MN, USA.
- Natal-da-Luz T, Tidona S, Jesus B, Morais PV, Sousa JP, 2009. The use of sewage sludge as soil amendment: the need for an ecotoxicological evaluation. *Journal of Soil and Sediments* 9: 246-260.

- 
- Nielsen MH and Ranck J, 1994 Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of Allium test. *Hereditas* 121: 249-254.
- Norberg-King TJ, Mount DI, Durhan EJ, Ankley GT, Burkhard LP, 1991. Methods for aquatic toxicity identification evaluations: phase I toxicity characterization procedures. EPA/600/6-91/003. US Environmental Protection Agency, Duluth, MN, USA.
- Pablos MV, Fernández C, Babín M.M, Navas JM, Carbonell G, Martini F, García-Hortiguera P, Tarazona JV, 2009. Use of a novel battery of bioassays for the biological characterization of hazardous wastes. *Ecotoxicology and environmental Safety* 72: 1594-1600.
- Pablos MV, Martini F, Fernández C, Babín M.M, Herraiz I, Miranda J, Martínez J, Carbonell G, San-Segundo L, García-Hortiguera P, Tarazona JV, 2011. Correlation between physicochemical and ecotoxicological approaches to estimate landfill leachates toxicity. *Waste Management* 31: 1841-1847.
- Pandard P., Devillers J. Charissou AM., Pouksen V., Jourdain MJ, Ferard JS, Grand C., Bispo A, (2006) Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of waste. *Science of the Total Environment* 363: 114-125.
- Pasini M.A., Marangoni E., Secondi A., Villa M. 2001 Impiego di saggi multispecie nella caratterizzazione ecotossicologica di diverse matrici acquose. 14° Congresso Internazionale dei biologi "Salute, Sicurezza e qualità: obiettivi di una professione". Altavilla Milicia (PA) 11/14 OTTOBRE 2001.
- Pattard M and Moser H, 2009. Luminescent bacteria test. In: Moser H, and Römbke J. *Ecotoxicological characterization of waste. Results and experiences of an international ring test*. Ed. Springer, pp. 105-116.
- Persoone G, Marsalek B, Törökne A, Zarina D, Manusadzianas L, Nalecz-Jawecki G, Tofan L, Stapanova N, Tothova L, Kolar B, 2003. A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters. *Environmental Toxicology* 18 (6): 395-402.
- Postma J.F., van der Sloot H.A and Van Zomeren A. 2009. Ecotoxicological Response of the Three Waste Samples in Relation to Chemical Speciation Modeling of Leachates. In: Moser H, and Römbke J. *Ecotoxicological characterization of waste. Results and experiences of an international ring test*. Ed. Springer pp245-258
- Persoone G, and Wadhia K, 2009. Comparison between Toxkit Microbiotests and standard tests. In: Moser H, and Römbke J. *Ecotoxicological characterization of waste. Results and experiences of an international ring test*. Ed. Springer pp 213-222.
- Radesky CM, Férard JF, Blaise C, 1995. A semistatic microplate-based phytotoxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14: 299-302.
- Read HW, Harkin JM, and Gustavson KE, 1998. Environmental applications with submitochondrial particles. In *Microscale Testing in Aquatic Toxicology* (Well PG, Lee K, and Blaise C, Eds) pp 31-52 CRC Press, Boca Raton, FL.
- Renoux AY, Tyagi RD, Samson R, 2001. Assessment of toxicity reduction after metal removal in bioleached sewage sludge. *Water Research* 35: 1415-1424
- Robidoux PY, López-Gastey J, Choucri A, Sunahara GI, 1998. Procedure to screen illicit discharge of toxic substances in septic sludge received at wastewater treatment plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 39: 31-40
- Rojičková-Padrťová R, Maršálek B, Holoubek I, 1998. Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: selection of an optimal test battery. *Chemosphere* 37: 495-507.

---

Römbke J, Moser H, and Moser t. 2009 Overview on the Results of the ring test. In: Moser H, and Römbke J. Ecotoxicological characterization of waste. Results and experiences of an international ring test. Ed. Springer pp 3- 26.

Römbke J, Moser Th, Moser H, 2009. Ecotoxicological characterisation of 12 incineration ashes using 6 laboratory tests. *Waste Management* **29**: 2475-2482.

Schirmer K, Chan AGJ, Greenberg BM, Dixon DG, Bols NC, 1997. Methodology for demonstrating and measuring the phototoxicity of fluoranthene to fish cells in culture. *Toxicology in vitro* **11**: 107-119.

Schirmer K, Dixon DG, Greenberg BM, Bols NC, 1998. Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. *Toxicology* **127**: 129-141.

Schirmer K, Chan AGJ, Bols NC, 2000. Transitory metabolic disruption and cytotoxicity elicited by benzo[a]pyrene in two cell lines from rainbow trout liver. *Journal of Biochemical Molecular Toxicology* **14**: 262-276.

Schirmer K, Dayeh VR, Bopp SK, Russold S, Bols NC, 2004. Applying whole water samples to cell bioassays for detection dioxin-like compounds at contaminated sites. *Toxicology* **200**: 211-221.

Schultz E, Vaajasaari K, Joutti A, and Ahtiainen J, 2002. Toxicity of industrial wastes and waste leachin test eluates containing organic compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **52**: 248-255.

Snell TW, and Janssen CR, 1995. Rotifers in ecotoxicology: a review. *Hydrobiologia* **313/314**: 231-247.

Spohn C, and Gurin M, 2011. Waste Management World vol. 12. <http://www.waste-management-world.com/index/current-issue.html>

Sprague JB, Ramsay BA, 1965. Lethal effects of mixed copper and zinc solutions for juvenile salmon. *Journal of Fish Research Bd. Can.* **22**: 425-432.

Stiernström S, Hemström K, Wik K, Carlsson G, Bengtsson B-E, Breitholtz M, 2011. An ecotoxicological approach for hazard identification of energy ash. *Waste Management* **31**: 342-352.

Van der Hoeven N, 2004. Current issues in statistics and models for ecotoxicological risk assessment. *Acta Biotheoretica* **52**: 201-217.

Van der Sloot HA, and Van Zomeren A, 2009. Leaching and Chemical Speciation Modeling of Waste In: Moser H, and Römbke J. Ecotoxicological characterization of waste. Results and experiences of an international ring test. Ed. Springer pp 231-243.

Van Vlaardingen PLA, Traas TP, Wintersen AM, Aldenberg T, 2004. ETX-2.0. A program to calculate hazardous concentrations and fraction affected based on normally distributed toxicity data.

Vindimian R, Garric J, Flammarion P, Thybaud E and Babuts M, 1999. An index of effluent aquatic toxicity designed by partial least squares regression, using acute and chronic tests and expert judgements. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**: 2386-2391.

Wagner C, and Lokke H, 1991. Estimation of ecotoxicological protection levels from NOEC toxicity data. *Water Research* **25**: 1237- 1242.

Wang F, Leung AOW., Wu MS., Yang M.S, Wong MH, 2009. Chemical and ecotoxicological analyses of sediments and elutriates of contaminated rivers due to e-waste recycling activities using a diverse battery bioassay. *Environmental Pollution* **157**: 2082-2090.

Weed DL, 2005. Weight of Evidence. A review of concept and methods. *Risk Analysis* **25**: 1545-1557.

---

Weideborg M, Vik EA, Ofjord GD, and Kjonno O, 1997. Comparison of three marine screening tests and four Oslo and Paris Commission procedures to evaluate toxicity of offshore chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 384-389.

Wilke B-M, Winkel B, Fleischmann S, and Gong P, 1998. Higher plant growth and microbial toxicity tests for the evaluation of the ecotoxic potential of soils. In: Contaminated soil. Ed. Thomas Terford, London UK, pp 345-354.

Wilke B-M, Riepert F, Koch C, Kühne T, 2008. Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70: 283-293.

Wik A, Nilsson E, Torsten K, Tobiesen A, Dave G, 2009. Toxicity assessment of sequential leachates of tire powder using a battery of toxicity tests and toxicity evaluation. *Chemosphere* 77: 922-927.

Yang MS, Fong WF, Chan TC, Chui VWD, Wong MH, 1993. Feasibility studies on the use of sewage sludge as supplementary feeds for rearing Tilapia: PCBs of the treated fish and biochemical response in the fish liver. *Environmental Technology* 14: 1163-1169.



---

## 6. NORME E METODI

AFNOR NF X 31-201 (1982). Essai de inhibition de germination de semences par une substance.

AFNOR T90-304 (1980).. Détermination de l'inhibition de croissance de *Scenedesmus subspicatus* par une substance. Norme expérimentale.

AFNOR T90-320 (1991). Détermination de l'inhibition de luminescence de *Photobacterium phosphoreum*. Norme expérimentale.

AFNOR T 90-301 (1996) Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test.

AFNOR. T90-375 (1998) Water quality — Determination of water chronic toxicity by growth inhibition of the fresh water algae *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*).

AFNOR. T90-376 (2000) Water quality — Determination of chronic toxicity *Ceriodaphnia dubia* in 7 days. Population growth inhibition test.

AFNOR. T90-320-3 (1999) Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 3: Method using freeze-dried bacteria.

*ASTM D5660 – 96 (2009). Standard Test Method for Assessing the Microbial Detoxification of Chemically Contaminated Water and Soil Using a Toxicity Test with a Luminescent Marine Bacterium.*

Blaise C, Leagult N, Bermingham N, Van Coillie R, and Vasseur P, 1986. A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment. *Toxicity Assessment* 1: 261-281.

Blaise C, Forghani R, Legault R, Guzzo J, Dubow MS, 1994. A bacterial toxicity assay performed with microplates, microluminometry and Microtox reagent. *BioTechniques* 16: 932-937.

Breitholtz M, Bengtsson B-E, 2001. Oestrogens have no hormonal effect on the development and reproduction of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*. *Marine Pollution Bulletin* 42: 879-886.

Breitholtz M, Wollenberger L, 2003. Effects of three PBDEs on development reproduction and population growth rate of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*. *Aquatic Toxicology* 64: 85-96.

Bulich AA, 1979. Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments. *Aquatic Toxicology* 667: 98-106.

Centeno MDF, Persoone G, and Goyvaerts MP, 1995. Cyst-based toxicity tests IX. The potential of *Thamnocephalus platyurus* as test species in comparison with *Streptocephalus proboscideus* (Crustacea: Brachiopoda, Anostraca). *Environmental Toxicology and Water Quality* 10: 275-282.

*Environmental Canada (2002). Biological test methods for measuring the toxicity of contaminated soil to earthworms (Eisenia sp. or Lumbricus terrestris). Environmental Protection Series Biological Test Methods. Method Development and Applications Section. Reports EPS 1/RM/ Environmental Technology Centre Environment Canada, Ottawa, Ontario.*

*CEMD (Czech Environmental Ministry Directive, Ministry of Environment of the Czech Republic) (2003) Newsletter 6/2003. Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicity odpadů (in Czech).*

*Creasel, 1992. Rotoxkit F<sup>TM</sup>. Rotifer toxicity screening test for freshwater. Standard Operational Procedure. Deinze, Belgium.*

---

Creasel, 2001. *Ostracodtoxkit F<sup>TM</sup>*. Chronic “Direct contact” toxicity test for freshwater sediments. Standard Operational Procedure. Deinze, Belgium.

DIN 38412 – L8 (1991) *Pseudomonas putida*

DIN 38412-L30 (1989) + L11 (1981) *Daphnia* Acute Toxicity test

DIN 38412 - L33 (1991) Algae Growth Inhibition

DIN 38412 - L34 (1991/1993) Luminiscence Inhibition

DIN 38412 - L37 (1997) Luminescent bacteria test

DIN 38412-48 (2002) Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L) - Teil 48: *Arthrobacter globiformis*-Kontakttest für kontaminierte Feststoffe (L 48).

EPA 1994 *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms*. EPA 600/4-91/002, Environmental Systems Laboratory, Cincinnati, OH.

Ferrari B, Féraud JF, 1996. Effects of nutritional renewal frequency on survival and reproduction of *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 765-770.

French Ministry of Environment 1998. *Criteria and methods for the assessment of the ecotoxicity of wastes*. French Ministry of Environment/Directorate for Prevention Pollution and Risk Control, January, Paris.

ISO 5725-2 “Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method”.

ISO 6341 (1996). Water quality -- Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) -- Acute toxicity test.

ISO 7346-1 (1996) Water quality -- Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] -- Part 1: Static method.

ISO 8692 (2004) *Water quality – Freshwater algal growth inhibition test with Desmodesmus subspicatus and Pseudokirchneriella subcapitata*.

ISO 10712 (1995). *Water quality - Pseudomonas putida growth inhibition test (Pseudomonas cell multiplication inhibition test)*.

ISO 11267 (1999). Soil quality -- Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants.

ISO 11268-1 (1993) Soil quality -- Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) -- Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate.

ISO 11268-2 (1998) Soil quality -- Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) -- Part 2: Determination of effects on reproduction

ISO 11269-1 (1993) Soil quality -- Determination of the effects of pollutants on soil flora -- Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth.

ISO 11269-2 (2005). Soil quality -- Determination of the effects of pollutants on soil flora -- Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants.

---

ISO 11348 -1 (2007). Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) -- Part 1: Method using freshly prepared bacteria.

*ISO 11348 -2 (1998). Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test). Part 2: Method using liquid dried bacteria*

*ISO 11348 -3 (1998). Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test). Part 3: Method using freeze dried bacteria.*

ISO 13829 (2000). Water quality - Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test.

ISO 15088 (2007). Water quality -- Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*).

ISO 16387 (2004) Soil quality -- Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) -- Determination of effects on reproduction and survival.

ISO 17155 (2002) Soil quality -- Determination of abundance and activity of soil microflora using respiration curves

ISO 17512 - 1 (2008) Soil quality -- Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour -- Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*).

ISO 20079 (2005). Water quality -- Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (*Lemna minor*) -- Duckweed growth inhibition test

ISO 20665 (2008) Water quality -- Determination of chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia*.

ISO 20666 (2008) Water quality - Determination of the chronic toxicity to *Brachionus calyciflorus* in 48 h.

*Lukavský J, 1992. The evaluation of algal growth potential (AGP) and toxicity of water by miniaturized growth bioassay. Water Research 26: 1409-1413.*

*NIWA (1998). Freshwater Algae (Selenastrum capricornutum) chronic toxicity test protocol. <http://www.mfe.govt.nz/publications/water/chole-effluent-toxicity-nov98/whole-effluent-toxicity-appendix-4-nov98.pdf>.*

NEN 7349. Leaching characteristic of solid earthy and stony building and waste materials: Leaching test. Determination of the leaching of inorganic components from granular materials with the cascade test. Netherland Normalisatie-instituut, Delft, 1995.

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

*OECD Guidelines for the testing of chemicals. Daphnia sp., Acute Immobilization Test and Reproduction test. Guideline 202 (1993).*

OECD Guidelines for the testing of chemicals. Earthworm acute toxicity test. Guideline 207 (1984).

OECD Guidelines for the testing of chemicals. Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test. Guideline 208 (2006).

OECD Guidelines for the testing of chemicals. Soil microorganisms: carbon transformation test. Guideline 217 (2000)

OECD Guidelines for the testing of chemicals. Lemna growth inhibition test. Guideline 221 (2002).

---

OECD Guideline for the testing of chemicals. Fish Embryo Toxicity (FET) test. Draft proposal for a new guideline 2006.

Le Du-Delepierre A, Persoone G, Grolière CA, 1996. A new low cost microbiotest with the freshwater ciliate protozoan *Spirostomum ambiguum*. Definition of culturing conditions. *Hydrobiologia* 325: 121-130.

Mount DI, Norberg Tj, 1984. A seven-day life-cycle Cladoceran test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 3: 425-434.

Radesky CM, Férard JF, Blaise C, 1995. A semistatic microplate-based phytotoxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14: 299-302.

SIS 1991. Determination of acute lethal toxicity of chemical substances and effluents to *Nitocra spinipes* Boeck-static procedure (in Swedish). Swedish Standard SS-02-81-06. SIS-standardiseringskommissionen i Sverige, Stockhol., Sweden.

Snell TW, and Janssen CR, 1995. Rotifers in ecotoxicology: a review. *Hydrobiologia* 313/314: 231-247.

Unger M, Ek K, 1994. Reproduktionstest med vattenloppan *Ceriodaphnia dubia*. ITM-rapport 20. Institutet för Tillämpad Miljöforskning, Stockholm University (in Swedish).

UNI EN 14735 (2005) Caratterizzazione dei rifiuti - Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche.

UNI CEN/TS14429 (2006) Caratterizzazione dei rifiuti - Prove di comportamento alla lisciviazione - Influenza del pH sulla lisciviazione con aggiunta iniziale di acido/base.

UNI EN 12457-2 (2004) Caratterizzazione dei rifiuti - Lisciviazione - Prova di conformità per la lisciviazione di rifiuti granulari e di fanghi - Parte 2: Prova a singolo stadio, con un rapporto liquido/solido di 10 l/kg, per materiali con particelle di dimensioni minori di 4 mm (con o senza riduzione delle dimensioni).

UNI CEN/TS 14405 (2004) Caratterizzazione dei rifiuti - Prove di comportamento alla lisciviazione - Prova di percolazione a flusso ascendente (nelle condizioni specificate).

Yang MS, Fong WF, Chan TC, Chui VWD, Wong MH, 1993. Feasibility studies on the use of sewage sludge as supplementary feeds for rearing *Tilapia*: PCBs of the treated fish and biochemical response in the fish liver. *Environmental Technology* 14: 1163-1169.

## 7. ALLEGATI

### Allegato 1

#### CEN/TC 292 –Documenti pubblicati

Standard reference	Title	Directive (Citation in Official Journal of the European Union)
CEN/TR 14589:2003	Characterization of waste - State of the art document - Chromium VI specification in solid matrices	-
CEN/TR 15018:2005	Characterization of waste - Digestion of waste samples using alkali-fusion techniques	-
CEN/TR 15310-1:2006	Characterization of waste - Sampling of waste materials - Part 1: Guidance on selection and application of criteria for sampling under various conditions	99/31/EC (No)
CEN/TR 15310-2:2006	Characterization of waste - Sampling of waste materials - Part 2: Guidance on sampling techniques	99/31/EC (No)
CEN/TR 15310-3:2006	Characterization of waste - Sampling of waste materials - Part 3: Guidance on procedures for sub-sampling in the field	99/31/EC (No)
CEN/TR 15310-4:2006	Characterization of waste - Sampling of waste materials - Part 4: Guidance on procedures for sample packaging, storage, preservation, transport and delivery	99/31/EC (No)
CEN/TR 15310-5:2006	Characterization of waste - Sampling of waste materials - Part 5: Guidance on the process of defining the sampling plan	99/31/EC (No)
CEN/TR 16110:2010	Characterization of waste - Guidance on the use of ecotoxicity tests applied to waste	-
CEN/TR 16130:2011	Characterization of waste - On-site verification	-
CEN/TR 16184:2011	Characterization of Waste - State-of-the-art document - Analysis of eluates	-
CEN/TS 14405:2004	Characterization of waste - Leaching behaviour tests - Up-flow percolation test (under specified conditions)	99/31/EC (No)
CEN/TS 14429:2005	Characterization of waste - Leaching behaviour tests - Influence of pH on leaching with initial acid/base addition	99/31/EC (No)
CEN/TS 14997:2006	Characterization of waste - Leaching behaviour tests - Influence of pH on leaching with continuous pH-control	99/31/EC (No)
CEN/TS 15364:2006	Characterization of waste - Leaching behaviour tests - Acid and base neutralization capacity test	-
CEN/TS 16229:2011	Characterization of waste - Sampling and analysis of weak acid dissociable cyanide discharged into tailings ponds	-
EN 12457-1:2002	Characterisation of waste - Leaching - Compliance test for leaching of granular waste materials and sludges - Part 1: One stage batch test at a liquid to solid ratio of 2 l/kg for materials with high solid content and with particle size below 4 mm (without or with size reduction)	99/31/EC (No)
EN 12457-2:2002	Characterisation of waste - Leaching - Compliance test for leaching of granular waste materials and sludges - Part 2: One stage batch test at a liquid to solid ratio of 10 l/kg for materials with particle size below 4 mm (without or with size reduction)	99/31/EC (No)
EN 12457-3:2002	Characterisation of waste - Leaching - Compliance test for leaching of granular waste materials and sludges - Part 3: Two stage batch test at a liquid to solid ratio of 2 l/kg and 8 l/kg for materials with high solid content and with particle size below 4 mm (without or with size reduction)	99/31/EC (No)
EN 12457-4:2002	Characterisation of waste - Leaching - Compliance test for leaching of granular waste materials and sludges - Part 4: One stage batch test at a liquid to solid ratio of 10 l/kg for materials with particle size below 10 mm (without or with size reduction)	99/31/EC (No)
EN 12506:2003	Characterization of waste - Analysis of eluates - Determination of pH, As, Ba, Cd, Cl-, Co, Cr, Cr VI, Cu, Mo, Ni, NO <sub>2</sub> -, Pb, total S, SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , V and Zn	-
EN 12920:2006+A1:2008	Characterization of waste - Methodology for the determination of the leaching behaviour of waste under specified conditions	-
EN 13137:2001	Characterization of waste - Determination of total organic carbon (TOC) in waste, sludges and sediments	-
EN 13370:2003	Characterization of waste - Analysis of eluates - Determination of Ammonium, AOX, conductivity, Hg, phenol index, TOC, easily liberatable CN-, F-	-
EN 13656:2002	Characterization of waste - Microwave assisted digestion with hydrofluoric (HF), nitric (HNO <sub>3</sub> ) and hydrochloric (HCl) acid mixture for subsequent determination of elements	99/31/EC (No)
EN 13657:2002	Characterization of waste - Digestion for subsequent determination of aqua regia soluble portion of elements	99/31/EC (No)
EN 13965-1:2004	Characterization of waste - Terminology - Part 1: Material related terms and definitions	-
EN 13965-2:2010	Characterization of waste - Terminology - Part 2: Management related terms and definitions	-
EN 14039:2004	Characterization of waste - Determination of hydrocarbon content in the range of C10 to C40 by gas chromatography	-
EN 14345:2004	Characterization of waste - Determination of hydrocarbon content by gravimetry	-
EN 14346:2006	Characterization of waste - Calculation of dry matter by determination of dry residue or	99/31/EC (No)

Standard reference	Title	Directive (Citation in Official Journal of the European Union)
	water content	
EN 14582:2007	Characterization of waste - Halogen and sulfur content - Oxygen combustion in closed systems and determination methods	-
EN 14735:2005	Characterization of waste - Preparation of waste samples for ecotoxicity tests	-
EN 14735:2005/AC:2006	Characterization of waste - Preparation of waste samples for ecotoxicity tests	-
EN 14899:2005	Characterization of waste - Sampling of waste materials - Framework for the preparation and application of a Sampling Plan	99/31/EC (No)
EN 15002:2006	Characterization of waste - Preparation of test portions from the laboratory sample	99/31/EC (No)
EN 15169:2007	Characterization of waste - Determination of loss on ignition in waste, sludge and sediments	-
EN 15192:2006	Characterisation of waste and soil - Determination of Chromium(VI) in solid material by alkaline digestion and ion chromatography with spectrophotometric detection	-
EN 15216:2007	Characterization of waste - Determination of total dissolved solids (TDS) in water and eluates	-
EN 15308:2008	Characterization of waste - Determination of selected polychlorinated biphenyls (PCB) in solid waste by using capillary gas chromatography with electron capture or mass spectrometric detection	-
EN 15309:2007	Characterization of waste and soil - Determination of elemental composition by X-ray fluorescence	99/31/EC (No)
EN 15527:2008	Characterization of waste - Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in waste using gas chromatography mass spectrometry (GC/MS)	86/278/EEC (No)

Aggiornato al 08/2011

**CEN/TC 292 – Documenti in preparazione**

Project reference	Title	Current status	DAV
FprEN 15875	Characterization of waste - Static test for determination of acid potential and neutralisation potential of sulfidic waste	Under Approval	2011-11
FprCEN/TS 15862	Characterization of waste - Compliance leaching test - One stage batch leaching test for monoliths at fixed liquid to surface area ratio (L/A) for test portions with fixed minimum dimensions	Under Approval	2011-02
FprCEN/TS 15863	Characterisation of waste - Leaching behaviour test for basic characterisation - Dynamic Monolithic Leaching Test with periodic leachant renewal, under fixed test conditions	Under Approval	2011-02
FprCEN/TS 15864	Characterisation of waste - Leaching behaviour test for basic characterisation - Dynamic Monolithic Leaching Test with continuous leachant renewal under conditions relevant for specified scenario(s)	Under Approval	2011-02
FprCEN/TR 16176	Characterization of waste - Screening methods for elemental composition by X-ray fluorescence spectrometry for on-site verification	Under Approval	2011-12
prEN 16123	Characterization of waste - Guidance on selection and application of screening methods	Under Approval	2013-04
	'Characterization of waste - Kinetic testing for assessing acid generation potential of sulfidic waste from extractive industries	Under Drafting	2012-05
	Characterization of waste - Overall guidance document for characterization of waste from extractive industries	Under Drafting	2012-05
	Characterization of waste - Sampling of waste from extractive industries	Under Drafting	2012-05
prEN 16023	Characterization of waste - Determination of calorific value	Under Approval	2012-09

Aggiornato al 08/2011