

«C.13 Bioaccumulo nei pesci: esposizione attraverso l'ambiente acquatico e per via alimentare

INTRODUZIONE

Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 305 (2012). L'obiettivo principale della presente revisione del metodo di prova è duplice. In primo luogo, essa è intesa a includere una prova di bioaccumulo per via alimentare ⁽¹⁾ idonea a determinare il potenziale di bioaccumulo delle sostanze a bassa solubilità in acqua. In secondo luogo, intende elaborare un metodo di prova che utilizzi, ove possibile, un minor numero di pesci nel rispetto del principio del benessere degli animali, e che risulti più efficiente in termini di costi.

Negli ultimi anni, dopo l'adozione del metodo di prova C.13 consolidato (1), sono state saggiate numerose sostanze e tanto i laboratori che le autorità di regolamentazione hanno maturato una notevole esperienza. Ciò ha portato alla convinzione che la prova possa essere semplificata in presenza di determinate condizioni (cfr. paragrafo 88) e che sia possibile adottare un approccio graduale. L'esperienza ha anche dimostrato che i fattori biologici quali la crescita e il contenuto lipidico del pesce possono avere un forte impatto sui risultati e che pertanto è necessario tenerne conto. Inoltre, è stato riconosciuto che la sperimentazione su sostanze scarsamente solubili in acqua non è tecnicamente realizzabile. Inoltre, per le sostanze con scarsa idrosolubilità in acqua, l'esposizione attraverso l'ambiente acquatico può essere meno importante rispetto all'esposizione per via alimentare. Per questo motivo è stato sviluppato un metodo di prova in cui i pesci sono esposti alla sostanza da testare attraverso la dieta (cfr. paragrafi 7-14 e 97). La validazione (mediante prova interlaboratorio) del metodo con esposizione per via alimentare è stata eseguita nel 2010 (51).

Le principali modifiche apportate al metodo di prova sono le seguenti:

- si può ormai considerare sufficiente testare un'unica concentrazione quando il fattore di bioconcentrazione (BCF) è con ogni probabilità indipendente dalla concentrazione;
- è possibile, in presenza di criteri specifici, elaborare una prova ridotta di esposizione in ambiente acquatico, con un numero limitato di punti di campionamento;

⁽¹⁾ Cfr. appendice 1, Definizioni e unità di misura.

- il contenuto lipidico del pesce dovrebbe essere misurato in modo che il BCF possa essere espresso sulla base di un tenore di grassi del 5 %.
- maggiore enfasi sulla stima del fattore di bioconcentrazione (BCF) cinetico (se possibile), in aggiunta alla stima del BCF allo stato stazionario;
- per alcuni gruppi di sostanze, sarà proposta una prova mediante esposizione per via alimentare, se ciò è ritenuto più adatto rispetto ad una prova di esposizione in ambiente acquatico;
- il peso del pesce va misurato in modo che il BCF_k possa essere corretto dall'effetto di diluizione dovuto alla crescita.

Prima di effettuare le prove di bioaccumulo, devono essere note le seguenti informazioni sulla sostanza in esame:

- a) sensibilità del metodo d'analisi per la misurazione delle concentrazioni presenti nei tessuti, nell'acqua o nel cibo sia della sostanza in esame sia dei suoi possibili metaboliti (cfr. paragrafo 65);
- b) solubilità in acqua [metodo di prova A.6 (2)]; va determinata secondo un metodo adatto per l'intervallo (stimato) di solubilità in acqua, in modo da ottenere un valore affidabile. Per le sostanze idrofobe si adopererà in genere il metodo di eluizione su colonna;
- c) coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua K_{ow} [metodi di prova A.8, A.24, A.23 (5) (4) (6)];⁽¹⁾ o altre informazioni adeguate sul comportamento della ripartizione (ad esempio, l'assorbimento di lipidi, K_{oc}); questa dovrebbe essere determinata secondo un metodo adeguato per l'intervallo (stimato) di K_{ow} per ottenere un valore affidabile. Per sostanze idrofobe, il metodo adeguato sarà quello dell'agitazione lenta [metodo di prova A.23 (6)];
- d) stabilità della sostanza in acqua (idrolisi [metodo di prova C.7 (7)]);
- e) stabilità della sostanza negli alimenti (in particolare quando è scelto il metodo di prova relativo all'esposizione per via alimentare);
- f) informazioni sulla fototrasformazione pertinenti per le condizioni di irraggiamento durante la prova (8);
- g) tensione superficiale (per sostanze per le quali non è possibile determinare il $\log K_{ow}$) [metodo di prova A.5 (9)];
- h) pressione di vapore [metodo di prova A.4 (10)];
- i) informazioni sulla degradazione biotica o abiotica nell'acqua, quali (ma non esclusivamente) la biodegradabilità rapida [metodo di prova C.4, parti da II a VII (11) C.29 (12)], se del caso;
- j) informazioni sui metaboliti: struttura, $\log K_{ow}$ formazione e degradabilità, se del caso;
- k) costante di dissociazione dell'acido (pK_a) delle sostanze che potrebbero ionizzare. Se necessario, il pH dell'acqua di prova deve essere regolato in modo da garantire che la sostanza si trovi in forma non ionizzata durante la prova, se compatibile con la specie ittica.

Indipendente dal sistema di campionamento o metodo di esposizione prescelto, il presente metodo descrive una procedura per caratterizzare il potenziale di bioaccumulo di una sostanza nei pesci. Benché i sistemi di prova a flusso continuo siano ampiamente preferibili, sono ammissibili sistemi semistatici, purché i criteri di validità (cfr. paragrafi 24 e 113) siano soddisfatti. Quando si utilizza il canale dell'esposizione alimentare, il sistema a flusso continuo non è necessario per mantenere concentrazioni acquose della sostanza in esame, ma contribuirà a mantenere un'adeguata concentrazione dell'ossigeno disciolto e ad assicurare acqua pulita e a eliminare le influenze, ad es. prodotti da escrezione.

⁽¹⁾ Talvolta indicati con P_{ow} ; determinati con il metodo del dibattimento in pallone nel metodo di prova A.8 (3), con il metodo HPLC nel metodo di prova A.24 (4) e con il metodo dell'agitazione lenta nel metodo di prova A.23 (5). La tecnica del generatore a colonna è talvolta utilizzata per la determinazione di $\log K_{ow}$. Un numero limitato di studi che utilizzano questa tecnica è disponibile, essenzialmente per le dibenzo-diossine e i difenili clorurati (e.g. Li and Doucette, 1993) (3). Per le sostanze ionizzabili, il $\log K_{ow}$ dovrebbe fare riferimento alla forma non ionizzata.

Indipendentemente dal metodo di prova prescelto, il presente metodo di prova fornisce sufficienti dettagli per eseguire la prova e al contempo lasciare la necessaria libertà per adattare il disegno sperimentale alle specifiche condizioni di laboratorio e alla variabilità delle caratteristiche delle sostanze analizzate. La prova relativa all'esposizione in ambiente acquatico è applicata appropriatamente alle sostanze organiche stabili con valori $\log K_{ow}$ tra 1,5 e 6,0 (13), ma è applicabile anche a sostanze fortemente idrofobe (con $\log K_{ow} > 6,0$), se può essere dimostrata una concentrazione della sostanza in esame stabile e pienamente disciolta in acqua. Se una siffatta concentrazione non può essere dimostrata, lo studio in acqua non sarebbe adeguato; pertanto, si renderebbe necessario ricorrere all'approccio relativo all'esposizione per via alimentare per saggiare una determinata sostanza nei pesci (anche se l'interpretazione e l'applicazione dei risultati della prova con esposizione alimentare può dipendere dal quadro normativo). Le stime preliminari del fattore di bioconcentrazione (BCF) (indicato talvolta con K_B) per le sostanze organiche con valori di $\log K_{ow}$ fino a circa 9,0 si possono ricavare dall'equazione di Bintein et al. (14). La stima preliminare del fattore di bioconcentrazione per tali sostanze fortemente idrofobe può essere più elevata del fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario (BCF_{ss}) prevedibilmente ottenuto mediante esperimenti di laboratorio, in particolare quando si utilizza un semplice modello lineare per la stima preliminare. I parametri che caratterizzano il potenziale di bioaccumulo includono la costante cinetica di assorbimento (k_1), costanti del tasso di perdita compresa la costante cinetica di depurazione (k_2), il fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario (BCF_{ss}), il fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_k) e il fattore di biomagnificazione alimentare (BMF) ⁽¹⁾.

Le sostanze radiomarcate in esame possono agevolare l'analisi dei campioni di pesce, acqua o cibo e possono essere utilizzate per stabilire se è necessario identificare e quantificare i metaboliti. Se si misurano solo i residui radioattivi totali (per esempio per combustione o solubilizzazione dei tessuti), il BCF o il BMF si basa sulla sostanza madre totale, eventuali metaboliti trattenuti e anche sul carbonio assimilato. I valori BMF o BCF basati sui residui radioattivi totali non sono pertanto confrontabili direttamente con un BCF o BMF ottenuto mediante analisi chimica specifica della sola sostanza madre. Procedure di separazione, quali TLC, HPLC o GC possono essere impiegate negli studi con marcatore radioattivo prima dell'analisi per determinare il BCF o BMF basato sulla sostanza madre ⁽²⁾. Quando si utilizzino tecniche di separazione, vanno eseguite l'identificazione e la quantificazione della sostanza madre e dei relativi metaboliti (cfr. paragrafo 65) se si basano i valori BCF o BMF sulla concentrazione della sostanza madre nei pesci e non sui residui radiomarcati totali ⁽³⁾. È anche possibile combinare uno studio sul metabolismo o studio di distribuzione in vivo con uno studio di bioaccumulo mediante l'analisi e l'identificazione dei residui nei tessuti. La possibilità di metabolismo può essere prevista mediante strumenti adeguati (ad esempio l'OCSE Toolbox (15) e programmi QSAR proprietari).

La decisione sull'opportunità di effettuare una prova di esposizione per via alimentare o attraverso l'ambiente acquatico, e con quale dispositivo di prova, dovrebbe essere basata sugli elementi di cui al paragrafo 3 nonché sulla normativa in vigore. Ad esempio, per sostanze che hanno un elevato $\log K_{ow}$, ma continuano a presentare un'elevata solubilità in acqua, per quanto riguarda la sensibilità dei metodi d'analisi disponibili, va considerata in primo luogo un'esposizione attraverso l'ambiente acquatico. Tuttavia è possibile che le informazioni sull'idrosolubilità non siano definitive per questi tipi di sostanze idrofobe, pertanto prima di decidere il metodo da utilizzare (16) va esaminata la possibilità di preparare concentrazioni disciolte nell'ambiente acquatico stabili e misurabili (le emulsioni stabili non sono ammesse) utilizzabili per uno studio sull'esposizione attraverso l'ambiente acquatico. Non è possibile dare istruzioni esatte sulla metodologia da seguire in funzione dei criteri di esclusione della solubilità in acqua e del coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua, in quanto altri fattori (tecniche di analisi, degradazione, adsorbimento, ecc.) possono avere notevoli ripercussioni sulla applicabilità del metodo, per i motivi sopra esposti. Tuttavia, a partire da un $\log K_{ow}$ superiore a 5 e di una solubilità in acqua inferiore ~ 0.01-0,1 mg/l le prove da esposizione attraverso l'ambiente acquatico diventano sempre più difficili.

Devono essere considerati altri fattori che possono influenzare la scelta della prova, tra cui il contenuto del potenziale d'adsorbimento nei recipienti e nei dispositivi di prova, la sua stabilità in soluzione acquosa rispetto alla stabilità nel mangime per pesci (17) (18), ecc.

⁽¹⁾ Cfr. appendice 1, Definizioni e unità di misura.

⁽²⁾ CPT: cromatografia su strato sottile; HPLC: cromatografia liquida ad alta pressione; GC: cromatografia in fase gassosa.

⁽³⁾ In alcuni quadri normativi le analisi dei metaboliti possono essere obbligatorie qualora siano soddisfatte talune condizioni (cfr. paragrafo 65).

Altri studi in ambiente acquatico possono contenere informazioni sugli aspetti pratici. Maggiori informazioni sulla valutazione di aspetti relativi all'esecuzione di studi di bioaccumulo sono disponibili in letteratura [cfr. ad esempio (19)].

Per le sostanze per le quali la solubilità o il mantenimento della concentrazione acquosa e l'analisi di questa concentrazione non rappresentano alcun vincolo alla realizzazione di un'esposizione in ambiente acquatico, tale metodo deve essere preferito per determinare il potenziale di bioconcentrazione della sostanza. In ogni caso, è necessario verificare che la o le concentrazioni di esposizione in ambiente acquatico da applicare rientrino nell'intervallo della solubilità nel mezzo di prova. Diversi metodi possono essere utilizzati per mantenere stabili le concentrazioni della sostanza in esame disciolta, quali l'uso di soluzioni madre o di sistemi di dosaggio passivo (ad esempio metodo dell'eluizione su colonna), purché si possa dimostrare che le concentrazioni possono essere mantenute stabili e i mezzi di prova rispettano le raccomandazioni di cui al paragrafo 27).

Per le sostanze fortemente idrofobe ($\log K_{ow} > 5$ e una solubilità inferiore $\sim 0,01-0,1$ mg/l), le prove tramite esposizione in ambiente possono diventare sempre più problematiche. La difficoltà può venire dal fatto che non si riesce a mantenere la concentrazione acquosa ad un livello ritenuto sufficientemente costante (ad esempio, a causa di fenomeni di adsorbimento verso i contenitori di vetro o di un rapido assorbimento dei pesci) o del fatto che le concentrazioni da applicare sono basse e si situano nello stesso ordine di grandezza del limite analitico di quantificazione o sono inferiori allo stesso ⁽¹⁾. Per queste sostanze fortemente idrofobe, si raccomanda di effettuare la prova per via alimentare, a condizione che tale prova sia coerente con il quadro normativo pertinente e gli obblighi di valutazione dei rischi.

Per i tensioattivi, occorre esaminare la fattibilità della prova di bioconcentrazione in ambiente acquatico, tenendo conto delle proprietà della sostanza; in caso contrario lo studio per via alimentare è probabilmente più adeguato. I tensioattivi sono agenti di superficie, che riducono la tensione interfacciale tra due liquidi. La loro natura anfifilica (vale a dire che contengono sia un gruppo idrofilo sia un gruppo idrofobo) fa sì che si accumulino alle interfacce, quali l'interfaccia acqua-aria, l'interfaccia acqua-cibo e pareti di vetro, il che impedisce di determinare la loro concentrazione acquosa.

La sperimentazione per via alimentare può eludere talune difficoltà di esposizione a miscele complesse i cui componenti presentano differenti limiti di solubilità in acqua, in quanto è più probabile ottenere un'esposizione comparabile di tutti i componenti della miscela per via alimentare rispetto ad un'esposizione in ambiente acquatico [cfr. (20)].

Va osservato che il metodo per via alimentare permette di ottenere un fattore di biomagnificazione alimentare (BMF) e non un fattore di bioconcentrazione (BCF) ⁽²⁾. Sono disponibili metodi per stimare un fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_k) a partire dai dati ottenuti nello studio per via alimentare (come discusso nell'appendice 8), ma dovrebbero essere utilizzati con cautela. In generale, tali metodi presuppongono una cinetica di primo ordine e sono applicabili soltanto a determinati gruppi di composti. È improbabile che tali approcci possano essere applicati ai tensioattivi (cfr. paragrafo 12).

Un impianto di prova minimo di esposizione in ambiente acquatico con un minor numero di punti di campionamento per ridurre il numero di animali e/o delle risorse (cfr. paragrafi 83 e segg.) dovrebbe essere applicato esclusivamente alle sostanze per le quali vi sia motivo di ritenere che l'assorbimento e la depurazione seguano approssimativamente una cinetica di primo ordine (vale a dire, in generale, le sostanze organiche non ionizzate, cfr. paragrafo 88).

⁽¹⁾ In generale, le concentrazioni misurate nell'acqua durante la fase di assorbimento dovrebbero essere di almeno un ordine di grandezza sopra il limite di quantificazione in modo che più di un tempo di dimezzamento del carico corporeo può essere misurato nella fase di depurazione dello studio.

⁽²⁾ Cfr. appendice 1, Definizioni e unità di misura.

C.13 — I Prova di bioconcentrazione nei pesci per esposizione attraverso l'ambiente acquatico

PRINCIPIO DEL METODO

La prova consta di due fasi: la fase di esposizione (assorbimento) e di post-esposizione (depurazione). Durante la fase di assorbimento, un gruppo di pesci di una stessa specie viene esposto alla sostanza in esame ad una o più concentrazioni prescelte, in funzione delle caratteristiche della sostanza in esame (cfr. paragrafo 49). Essi vengono poi trasferiti in un ambiente esente dalla sostanza in esame per la fase di depurazione. È sempre necessaria una fase di depurazione, salvo che la quantità di sostanza assorbita durante la fase di assorbimento sia insignificante. La concentrazione della sostanza in esame nel o sul pesce (o suo tessuto specificato) viene seguita in entrambe le fasi della prova. Oltre al gruppo di trattamento, un gruppo di controllo di pesci viene mantenuto in condizioni identiche ma senza esposizione alla sostanza in esame, per confrontare possibili effetti dannosi osservati nella prova di bioconcentrazione con un gruppo di controllo analogo e per ottenere la concentrazione di fondo della sostanza in esame ⁽¹⁾.

Nella prova di esposizione in ambiente acquatico, la fase di assorbimento dura solitamente 28 giorni. Tale periodo può essere prolungato se necessario (cfr. paragrafo 18), o abbreviato qualora sia dimostrato che lo stato stazionario è stato raggiunto anticipatamente (cfr. appendice 1, Definizioni e unità di misura). È possibile prevedere la durata della fase di assorbimento e del tempo necessario al raggiungimento dello stato stazionario attraverso le equazioni di cui all'appendice 5. Inizia quindi la fase di depurazione, in cui i pesci non sono più esposti alla sostanza in esame: i pesci sono trasferiti in un mezzo identico, ma privo della sostanza in esame, contenuto in una vasca pulita. È preferibile, nella misura del possibile, calcolare il fattore di bioconcentrazione in due modi: da un lato il fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario (BCF_{ss} ; cfr. appendice 1, Definizione), vale a dire il rapporto tra la concentrazione nel pesce (C_p) e la concentrazione nell'acqua (C_w); e, dall'altro, il fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_k ; cfr. appendice 1, Definizioni e unità di misura), vale a dire il rapporto tra la costante cinetica di assorbimento (k_1) e la costante cinetica di depurazione (k_2) presupponendo una cinetica di primo ordine ⁽²⁾.

Se lo stato stazionario non è raggiunto dopo 28 giorni, occorre calcolare il BCF con il metodo cinetico (cfr. paragrafo 38) oppure si può prorogare la fase di assorbimento. Se il tempo necessario per raggiungere lo stato stazionario è troppo lungo nella pratica (cfr. paragrafi 37 e 38, appendice 5), l'approccio cinetico è preferibile. In alternativa, per le sostanze fortemente idrofobe si esaminerà la possibilità di effettuare la prova per via alimentare, a condizione che quest'ultima rispetti la normativa in vigore ⁽³⁾.

La costante cinetica di assorbimento, la costante cinetica di depurazione (perdita) (o le costanti, se sono applicati sistemi più complessi), il fattore di bioconcentrazione (allo stato stazionario e/o cinetico) e, se possibile, gli intervalli di confidenza di ciascuno di questi parametri vengono calcolati sulla base del modello che meglio descrive le concentrazioni misurate di sostanza in esame nel pesce e nell'acqua (cfr. appendice 5).

L'aumento della massa dei pesci durante la prova si tradurrà in una diminuzione della concentrazione della sostanza in esame nel pesce (effetto noto come «effetto di diluizione dovuto alla crescita»), e pertanto il BCF cinetico sarà sottostimato se non corretto di conseguenza (cfr. paragrafi 72 e 73).

Il BCF è calcolato in base alla concentrazione totale nel pesce (ossia in funzione della massa umida totale dei pesci). Tuttavia, per scopi speciali, se il pesce è sufficientemente grande o può venire diviso in parti commestibili (filetto) e non commestibili (viscere), si possono usare determinati tessuti o organi (per esempio muscolo, fegato). Poiché per molte sostanze organiche esiste una chiara relazione tra il potenziale di bioconcentrazione e l'idrofobia, esiste anche una relazione corrispondente tra il contenuto lipidico dei pesci in esame e il valore osservato di bioconcentrazione di tali sostanze. Pertanto, allo scopo di ridurre questa fonte di variabilità nei risultati sperimentali per le sostanze altamente lipofile (cioè con $\log K_{ow} > 3$), la bioconcentrazione dovrebbe essere espressa in modo standardizzato per un pesce con un contenuto di grassi del 5 % (del peso corporeo totale), oltre alla bioconcentrazione ottenuta direttamente dalla prova. Ciò è necessario per comparare i risultati ottenuti da diverse sostanze e/o specie di prova. La percentuale del 5 % di tenore lipidico viene generalmente utilizzata, poiché ciò rappresenta di fatto il valore medio del contenuto di lipidi del pesce comunemente utilizzato nel presente metodo di prova (21).

⁽¹⁾ Per la maggior parte delle sostanze in esame, idealmente non si dovrebbe procedere ad alcun rilevamento nell'acqua di controllo. Le concentrazioni di fondo dovrebbero applicarsi solo ai materiali presenti in natura (ad esempio metalli) e alle sostanze largamente diffuse nell'ambiente.

⁽²⁾ Qualora sia evidente che non avviene una reazione di primo ordine, si devono impiegare modelli più complessi (cfr. bibliografia dell'appendice 5) con l'assistenza di un esperto di biostatistica.

⁽³⁾ L'assorbimento può essere limitato da una bassa concentrazione di esposizione a causa della scarsa solubilità in acqua nella prova di bioconcentrazione, mentre concentrazioni di esposizione molto maggiori possono essere ottenute nella prova con esposizione per via alimentare.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

Oltre alle proprietà della sostanza in esame elencate nell'introduzione (paragrafo 3), occorre conoscere anche la tossicità per le specie ittiche usate nella prova, preferibilmente la LC_{50} asintotica (cioè indipendente dal tempo) e/o la tossicità prevista durante le prove a lungo termine sui pesci [cfr. in particolare gli orientamenti dell'OCSE 210 (22), 212 (23), 215 (24)].

Occorre disporre di un metodo analitico di comprovata accuratezza, precisione e sensibilità, per la quantificazione della sostanza in esame nelle soluzioni di prova e nel materiale biologico, nonché le modalità per la preparazione e la conservazione dei campioni. Dovrebbe essere noto anche il limite analitico di quantificazione della sostanza di prova nell'acqua e nei tessuti del pesce. Se viene utilizzata una sostanza radiomarcata, essa dovrebbe essere della massima purezza (preferibilmente > 98 %) e la percentuale di radioattività associata alle impurità deve essere nota.

VALIDITÀ DELLA PROVA

Perché una prova sia valida devono essere soddisfatte le seguenti condizioni:

La variazione di temperatura dell'acqua è inferiore a ± 20 °C, in quanto grandi scostamenti possono influenzare i parametri biologici pertinenti per l'assorbimento e la depurazione, ma anche causare stress agli animali;

La concentrazione dell'ossigeno disciolto non scende al di sotto del 60 % della saturazione;

La concentrazione della sostanza in esame nelle vasche è mantenuta in un intervallo di ± 20 % intorno alla media dei valori misurati durante la fase di assorbimento;

La concentrazione della sostanza in esame è inferiore al limite di solubilità nell'acqua, tenendo conto dell'eventuale effetto dell'acqua di prova sulla solubilità reale ⁽¹⁾;

La mortalità, le malattie o altri effetti nocivi nei pesci trattati e di controllo sono minori del 10 % al termine della prova. Se la prova dura alcune settimane o mesi, il tasso di mortalità o altri effetti dannosi in entrambi i gruppi di pesci deve essere minore del 5 % al mese e non superare il 30 % in totale. Differenze significative in termini di crescita media dei campioni del gruppo di prova e del gruppo di controllo potrebbero indicare un eventuale effetto tossico della sostanza in esame.

SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Sarebbe utile disporre di sostanze di riferimento di cui si conosce il potenziale di bioconcentrazione e il metabolismo ridotto per verificare la procedura sperimentale, se del caso (ad esempio se il laboratorio non ha precedenti esperienze con l'esecuzione di tale prova o quando le condizioni sperimentali sono state modificate).

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiatura

Occorre evitare l'impiego di materiali — in tutte le parti dell'apparecchiatura sperimentale — che possono essere soggetti a dissoluzione, assorbimento o lisciviazione e avere un effetto dannoso sul pesce. Possono essere utilizzate vasche convenzionali rettangolari o cilindriche di materiale chimicamente inerte e di capacità adeguata al tasso di carico (cfr. paragrafo 43). È opportuno minimizzare l'uso di tubi di materia plastica flessibile; è opportuno scegliere un tubo in teflon®, in acciaio inossidabile o in vetro. L'esperienza ha dimostrato che in presenza di sostanze in esame con elevati coefficienti di adsorbimento, quali i piretroidi sintetici, potrebbe essere necessario utilizzare il vetro silanizzato. In tal caso le apparecchiature non possono essere riutilizzate. È opportuno esporre i sistemi di esame alle concentrazioni adeguate della sostanza in esame per il tempo necessario a dimostrare il mantenimento della stabilità delle concentrazioni di esposizione prima dell'introduzione degli organismi di prova.

⁽¹⁾ Per le sostanze multicomponenti, le sostanze UVCB e le miscele, si deve prendere in considerazione la solubilità in acqua di ogni componente al fine di determinare le opportune concentrazioni di esposizione.

Acqua

Ai fini della prova si usa in genere acqua naturale che dovrebbe essere ottenuta da una fonte non contaminata e di qualità uniforme. Tuttavia, l'acqua ricostituita (acqua demineralizzata in cui specifici nutrienti sono stati aggiunti in quantità note) può essere più adatta per garantire una qualità uniforme nel tempo. La qualità dell'acqua di diluizione, vale a dire l'acqua mescolata con la sostanza in esame prima di essere inserita nel recipiente di prova (cfr. paragrafo 30), deve essere di una qualità che permetta la sopravvivenza delle specie ittiche scelte per la durata del periodo di acclimatazione e del periodo di prova senza che presentino anomalie sul piano del comportamento o dell'apparenza. L'ideale sarebbe dimostrare che la specie in esame è in grado di sopravvivere, crescere e riprodursi nell'acqua di diluizione (per esempio in una coltura di laboratorio o in un saggio di tossicità sull'intero ciclo di vita). L'acqua di diluizione deve essere caratterizzata almeno dal pH, la durezza, i solidi totali, il carbonio organico totale (TOC) ⁽¹⁾ e di preferenza anche ammonio, nitriti e alcalinità nonché, per le specie marine, la salinità. I parametri che sono importanti ai fini del benessere dei pesci non sono perfettamente noti, ma l'appendice 2 fornisce concentrazioni massime raccomandate per un certo numero di parametri per le acque dolci e marine usate nella prova.

L'acqua di diluizione deve essere di qualità costante per tutta la durata della prova. Il pH deve essere compreso tra 6,0 e 8,5 all'inizio della prova, ma senza variare di oltre $\pm 0,5$ unità di pH nel corso dell'esperimento. Al fine di garantire che l'acqua di diluizione non abbia influenze indesiderate sul risultato sperimentale (per esempio per complessazione della sostanza in esame) o influenze negative sulla performance dello stock di pesce, ad intervalli si dovrebbero prelevare campioni per analisi, almeno all'inizio e alla fine della prova. Occorre determinare i metalli pesanti (ad esempio Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), i principali anioni e cationi (ad es. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , e SO_4^{2-}), i pesticidi (ad esempio pesticidi organofosforati totali e organoclorurati totali), il carbonio organico totale e i solidi in sospensione, ad esempio, ogni tre mesi, se l'acqua di diluizione è di qualità relativamente costante. Se la qualità dell'acqua si è dimostrata costante per almeno un anno, le titolazioni possono essere effettuate con minore frequenza (ad esempio ogni sei mesi).

Il contenuto naturale di particelle in sospensione nonché di carbonio organico totale nell'acqua di diluizione deve essere il più basso possibile per evitare un assorbimento della sostanza in esame su materia organica, il che ridurrebbe la biodisponibilità e porterebbe a sottostimare il BCF. Il valore massimo accettabile è di 5 mg/l per i solidi sospesi (materia secca che non passa attraverso un filtro da 0,45 μm) e di 2 mg/l per il carbonio organico totale (cfr. appendice 2). Se necessario, filtrare l'acqua di diluizione prima dell'uso. È opportuno che il contributo degli escrementi dei pesci sottoposti a prova e dei residui alimentari al contenuto di carbonio organico dell'acqua di prova sia il minore possibile (cfr. paragrafo 46).

Soluzioni di prova

Preparare una soluzione madre della sostanza in esame alla concentrazione adeguata. La soluzione madre deve essere preparata preferibilmente per semplice miscelazione o agitazione della sostanza in esame nell'acqua di diluizione. Un'alternativa idonea, in alcuni casi, è l'utilizzo di un sistema di dosaggio del desorbimento in fase solida. L'utilizzo di solventi o disperdenti (agenti solubilizzanti) è generalmente sconsigliato (cfr. (25)); il loro uso può essere accettabile per ottenere una soluzione madre alla concentrazione adeguata, ma occorre adoperarsi per ridurre al minimo l'uso di tali materiali e non superare la loro concentrazione micellare critica (se del caso). I solventi che possono essere utilizzati sono acetone, etanolo, metanolo, dimetilformammide e glicole trietilenico; disperdenti utilizzati sono Tween 80, metilcellulosa 0,01 % e HCO-40. La concentrazione di solvente nel mezzo di prova finale deve essere identica in tutti i trattamenti (vale a dire indipendentemente dalla concentrazione della sostanza in esame) e non dovrebbe superare i limiti di tossicità del solvente determinata nelle condizioni sperimentali. La concentrazione massima è di 100 mg/l (o 0,1 ml/l). È improbabile che una concentrazione di solvente di 100 mg/l modifichi significativamente la concentrazione della sostanza in esame disciolta, ottenibile nel mezzo di prova (25). Il contributo del solvente (insieme con la sostanza in esame) al contenuto complessivo di carbonio organico nell'acqua usata per il saggio deve essere noto. Durante l'intera prova, la concentrazione del carbonio organico totale nei recipienti di prova non deve superare la concentrazione di carbonio organico derivata dalla sostanza in esame, solvente o agente solubilizzante, se usato, di più di 10 mg/l (± 20 %) ⁽²⁾. Il contenuto di

⁽¹⁾ Il TOC include il carbonio organico del particolato e il carbonio organico disciolto, $\text{TOC} = \text{POC} + \text{DOC}$.

⁽²⁾ Pur non essendo generalmente raccomandati, se si utilizzano solventi o agenti solubilizzanti, il carbonio organico proveniente da tali agenti deve essere aggiunto al carbonio organico della sostanza in esame per valutare la concentrazione del carbonio organico nel recipiente di prova.

materia organica può avere un effetto significativo sul volume della sostanza in esame disciolta liberamente durante le prove con metodo a flusso continuo, soprattutto per le sostanze chimiche fortemente lipofile. La microestrazione in fase solida (cfr. paragrafo 60) può fornire importanti informazioni sul rapporto tra composti disciolti liberi e vincolati, considerati come frazione biodisponibile. La concentrazione della sostanza in esame dovrebbe essere inferiore al limite di solubilità della sostanza in esame nel mezzo di prova nonostante l'uso di un solvente o solubilizzante. Occorre utilizzare con cautela i solventi facilmente biodegradabili, poiché potrebbero causare problemi di crescita batterica nelle prove a flusso continuo. Se non è possibile preparare una soluzione madre senza l'impiego di un agente di solubilizzazione, occorre valutare l'opportunità di eseguire una prova di esposizione in ambiente acquatico anziché una prova per via alimentare.

Per le prove a flusso continuo occorre un sistema che eroghi e diluisca in continuo una soluzione madre della sostanza in esame (ad esempio pompa dosatrice, diluitor proporzionale, sistema di saturazione) o un sistema di dosaggio del desorbimento in fase solida, per ottenere la concentrazione desiderata nelle vasche sperimentali. Preferibilmente rinnovare il volume almeno cinque volte al giorno in vasca sperimentale. La modalità a flusso continuo va preferita, ma laddove non sia possibile (per esempio se ciò danneggiasse gli organismi sperimentali) si può utilizzare una tecnica semistatica, purché siano rispettati i criteri di validità (cfr. paragrafo 24). Le portate di soluzione madre e acqua di diluizione devono essere controllate 48 ore prima della prova e poi almeno una volta al giorno durante la prova. Nel corso di tale verifica, determinare la portata attraverso ciascuna vasca sperimentale e assicurare che la variazione non superi il 20 % all'interno di ciascuna camera e tra una vasca e l'altra.

Selezione della specie

Criteri importanti nella scelta delle specie sono la disponibilità, la possibilità di ottenerle di dimensioni adeguate e di mantenerle in modo soddisfacente in laboratorio. Altri criteri per la scelta delle specie ittiche includono un interesse ricreativo o commerciale, l'importanza ecologica nonché una sensibilità comparabile, utilizzi precedenti riusciti, ecc. Le specie sperimentali raccomandate sono indicate nell'appendice 3. Si possono usare anche altre specie, ma in tal caso la procedura di prova potrebbe dover essere adattata per ottenere condizioni sperimentali idonee. In tal caso occorre spiegare i criteri di scelta delle specie e del metodo sperimentale. In generale, l'uso di specie ittiche più piccole ridurrà il tempo di raggiungimento dello stato stazionario; tuttavia un numero maggiore di individui (campioni) sarà necessario per analizzare adeguatamente il contenuto lipidico e la concentrazione della sostanza in esame nel pesce. Inoltre, è possibile che le differenze di ritmo respiratorio e metabolismo tra pesci giovani e meno giovani possano ostacolare il raffronto dei risultati tra le diverse prove e le diverse specie. Si noti che eseguire la prova di tossicità sui pesci nelle prime fasi di vita (giovani) in rapida crescita, può rendere difficile l'interpretazione dei dati.

Mantenimento dei pesci (acqua e regime alimentare pertinenti per l'esposizione)

La popolazione ittica va acclimatata alle condizioni di laboratorio per almeno due settimane in acqua (cfr. paragrafo 28) alla temperatura di prova ed essere sufficientemente nutrita durante tutto il periodo (cfr. paragrafo 45). L'acqua e il regime alimentare devono essere dello stesso tipo di quelli destinati ad essere usati durante la prova.

Dopo un periodo di ambientazione di 48 ore, si registra la mortalità e si applicano i seguenti criteri:

- mortalità superiore al 10 % della popolazione in sette giorni: respingere l'intero lotto;
- mortalità compresa tra il 5 e il 10 % della popolazione in sette giorni: l'acclimatazione prosegue per altri sette giorni — in caso di mortalità superiore al 5 % durante il secondo periodo di sette giorni l'intero lotto viene respinto;
- mortalità inferiore al 5 % della popolazione in sette giorni: accettare il lotto.

I pesci usati nelle prove devono essere esenti da malattie o anomalie osservabili. È necessario eliminare qualsiasi pesce ammalato. Durante le due settimane precedenti la prova e durante la prova i pesci non devono ricevere trattamenti per malattie.

ESECUZIONE DELLA PROVA

Prova preliminare

Può essere utile condurre un esperimento preliminare allo scopo di ottimizzare le condizioni sperimentali della prova definitiva, per esempio la scelta delle concentrazioni della sostanza in esame e la durata delle fasi di assorbimento e di depurazione o per determinare se è necessario eseguire una prova completa. La prova preliminare deve essere concepita in modo tale da ottenere le informazioni richieste. Si può valutare se una sperimentazione ridotta possa essere sufficiente per ottenere un fattore di bioconcentrazione o se sia necessario uno studio completo sulla prova (cfr. i paragrafi da 83 a 95 sulla sperimentazione ridotta).

Condizioni di esposizione*Durata della fase di assorbimento*

La durata prevedibile della fase di assorbimento si può ricavare dall'esperienza pratica (per esempio da uno studio precedente o da un accumulo di studi su sostanze strutturalmente affini) o da certe relazioni empiriche, conoscendo la solubilità in acqua o il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua della sostanza in esame (a condizione che l'assorbimento segua una cinetica di primo ordine, cfr. appendice 5).

La fase di assorbimento deve durare 28 giorni, salvo dimostrazione che è stato raggiunto prima lo stato stazionario (cfr. appendice 1, Definizioni e unità di misura). Il raggiungimento dello stato stazionario nel tracciato della sostanza in esame nei pesci (C_f) in funzione del tempo avviene quando la curva diventa parallela all'asse del tempo e tre analisi successive di C_f su campioni prelevati ad intervalli di almeno due giorni danno valori che si collocano entro $\pm 20\%$ uno dall'altro, e non vi è alcun aumento significativo di C_f nel periodo di tempo trascorso tra la prima e l'ultima analisi successive. Quando si analizzano campioni raggruppati, sono necessarie almeno quattro analisi successive. Per il controllo di sostanze che vengono assorbite lentamente saranno più opportuni intervalli di sette giorni. Se lo stato stazionario non viene raggiunto entro 28 giorni, il BCF è calcolato utilizzando solo l'approccio cinetico, che non dipende dal raggiungimento dello stato stazionario, oppure può essere prolungata la fase di assorbimento, effettuando ulteriori misure, fino al raggiungimento dello stato stazionario o fino al 60° giorno (a seconda di quale periodo sia più breve). Inoltre, la concentrazione della sostanza in esame nel pesce alla fine della fase di assorbimento deve essere sufficientemente elevata da consentire una stima attendibile della costante k_2 a partire dalla fase di depurazione. Se nessun assorbimento significativo è accertato dopo 28 giorni, la prova può essere interrotta.

Durata della fase di depurazione

Per le sostanze che seguono una cinetica di primo ordine, un periodo pari a metà della durata della fase di assorbimento è solitamente sufficiente perché si verifichi una riduzione appropriata (per esempio del 95 %) del carico corporeo della sostanza (cfr. appendice 5 per una spiegazione della stima). Se il periodo necessario per raggiungere una perdita del 95 % è eccessivamente lungo, per esempio se supera il doppio della normale durata della fase di assorbimento (cioè oltre 56 giorni), si può utilizzare un periodo più breve (ad esempio, fino a che la concentrazione della sostanza in esame sia inferiore al 10 % della concentrazione allo stato stazionario). Tuttavia, possono essere necessari periodi di depurazione più lunghi per le sostanze che hanno caratteristiche di assorbimento e depurazione più complesse di quelle rappresentate da un modello ittico a compartimento singolo che segue una cinetica di primo ordine. Se si osservano o si prevedono tali fenomeni complessi, si consiglia di ricorrere all'assistenza di un esperto in biostatistica e/o farmacocinetica per garantire una corretta configurazione della prova. Se la fase di depurazione è prorogata, il numero di pesci da prelevare può diventare un ostacolo e le differenze nella crescita dei pesci possono influenzare i risultati. Il periodo dipenderà inoltre dal periodo durante il quale la concentrazione della sostanza in esame nel pesce rimane al di sopra del limite analitico di quantificazione.

Numero di pesci di prova

Scegliere il numero di pesci per ogni concentrazione di prova in modo da includere almeno quattro pesci per ciascun tempo di campionamento. I pesci sono raggruppati solo se non sia possibile l'analisi di un unico pesce. Se è richiesta una maggiore precisione nell'adattamento della curva (e nei parametri derivati) o se sono necessari gli studi sul metabolismo (ad esempio per distinguere tra i metaboliti e la sostanza madre quando si utilizzano sostanze radiomarcate), è necessario un maggior numero di pesci per punto di campionamento. Il contenuto di lipidi deve essere determinato possibilmente sullo stesso materiale biologico usato per determinare la concentrazione della sostanza in esame. Se ciò non fosse possibile, possono essere necessari ulteriori pesci (cfr. paragrafi 56 e 57).

Se si usano pesci adulti (cioè sessualmente maturi), essi non dovrebbero essere in stato di riproduzione o non essersi riprodotti di recente, sia prima che durante la prova. Occorre anche precisare il sesso dei pesci utilizzati. Se si utilizzano pesci di entrambi i sessi, occorre documentare che non vi sono differenze significative tra i sessi in termini di crescita e di contenuto lipidico prima dell'inizio dell'esposizione, in particolare se è previsto che sarà necessaria la messa in comune dei pesci maschi e femmine per ottenere concentrazioni rilevabili della sostanza e/o del contenuto di lipidi.

In tutte le prove è necessario scegliere pesci di peso simile, tale che il più piccolo abbia dimensioni non inferiori a due terzi del peso dei più grandi. I pesci dovrebbero essere tutti della stessa classe di età e avere la medesima provenienza. Poiché il peso e l'età di un pesce possono avere un effetto significativo sui valori del BCF (12), tali indicazioni devono essere registrate con precisione. Si raccomanda di pesare un sottocampione dello stock di pesce subito prima dell'inizio della prova per stimare il peso medio (cfr. paragrafo 61).

Carico

Usare elevati rapporti acqua/pesce per minimizzare la riduzione nella concentrazione della sostanza in esame nell'acqua derivante dall'aggiunta del pesce all'inizio della prova e per evitare riduzioni della concentrazione dell'ossigeno disciolto. È importante che il carico sia appropriato per la specie usata nella prova. In ogni caso si raccomanda normalmente un tasso di carico pesce/acqua di 0,1-1,0 g di pesce (peso umido) per litro d'acqua per giorno. Si possono utilizzare carichi pesce/acqua più elevati se si dimostra che la concentrazione della sostanza in esame non registra una variazione superiore a $\pm 20\%$, e che la concentrazione dell'ossigeno disciolto non scende al di sotto del 60 % della saturazione (cfr. paragrafo 24).

Nella scelta di appropriati regimi di carico si deve tener conto dell'habitat normale della specie ittica. Per esempio, le specie bentoniche, a parità di volume d'acqua, possono richiedere un acquario con area di base maggiore rispetto a quello destinato alle specie ittiche pelagiche.

Alimentazione

Durante i periodi di acclimatazione e di prova, occorre mantenere i pesci ad un regime alimentare appropriato, con un contenuto totale di lipidi e di proteine noto, in quantità sufficiente per mantenerli in buone condizioni di salute e mantenere costante il peso corporeo (è tollerata una certa crescita). Per tutto il periodo di acclimatazione e di prova somministrare ai pesci il cibo in una quantità fissa in funzione della specie utilizzata, alle medesime condizioni sperimentali e di un valore energetico stabile (ad esempio, per la trota iridea approssimativamente dall'1 % al 2 % del peso corporeo al giorno). La razione alimentare è definita in modo da evitare un rapido sviluppo e un forte aumento del tenore di grassi. La quantità di cibo somministrato deve venire ricalcolata ad intervalli appropriati, per esempio una volta alla settimana, per mantenere costanti il peso corporeo e il contenuto di lipidi. Per questo calcolo, si può stimare il peso dei pesci in ciascuna vasca sperimentale in base al peso del pesce campionato più recentemente nella stessa vasca. Non pesare i pesci rimasti nella vasca.

Cibo non consumato e feci vanno sifonati giornalmente dalle vasche sperimentali poco dopo la somministrazione del cibo (da 30 minuti a 1 ora). Mantenere vasche più pulite possibile per l'intera prova in modo che la concentrazione di materia organica rimanga per quanto possibile scarsa (cfr. paragrafo 29) perché la presenza di carbonio organico può limitare la biodisponibilità della sostanza in esame (12).

Poiché molti mangimi derivano da farina di pesce, occorre assicurarsi che il mangime non influenzi i risultati della prova o induca effetti nocivi, ad esempio se contiene (tracce di) pesticidi, metalli pesanti e /o la stessa sostanza in esame.

Illuminazione e temperatura

Si raccomanda un fotoperiodo di 12-16 ore e la temperatura dell'acqua ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) deve essere adatta alla specie utilizzata (appendice 3). Il tipo e le caratteristiche dell'illuminazione devono essere noti. Fare attenzione ad una possibile fototrasformazione della sostanza in esame alle condizioni di irraggiamento dello studio. Usare un'illuminazione appropriata evitando l'esposizione del pesce a fotoprodotto non naturali. In alcuni casi può essere appropriato utilizzare un filtro per bloccare la radiazione UV al di sotto di 290 nm.

Concentrazioni della sostanza in esame

Questa prova è stata inizialmente concepita per le sostanze organiche non polari. Per questo tipo di sostanza, l'esposizione del pesce a una concentrazione unica dovrebbe essere sufficiente, poiché non sono previsti effetti di concentrazione, benché il quadro normativo in vigore possa richiedere due concentrazioni. Se si saggiano altri tipi di sostanze, o se vi sono altre indicazioni di dipendenza della concentrazione, la prova deve essere effettuata con due o più concentrazioni. Se viene saggiata una sola concentrazione, occorre giustificare la scelta della concentrazione (cfr. paragrafo 79). Inoltre, la concentrazione deve essere la più bassa possibile o tecnicamente possibile (cioè non vicino al limite di solubilità).

In alcuni casi si può prevedere che la bioconcentrazione di una sostanza dipenda dalla concentrazione dell'acqua (ad esempio per i metalli, per i quali l'assorbimento da parte dei pesci può essere almeno in parte regolato). In tal caso può essere necessario analizzare almeno due, e possibilmente più (cfr. paragrafo 49), concentrazioni rilevanti per l'ambiente. Inoltre per le sostanze per le quali le concentrazioni devono, per ragioni pratiche, essere vicine al limite di solubilità, si raccomanda di analizzare almeno due concentrazioni, il che può dare un'idea dell'affidabilità delle concentrazioni di esposizione. Tra le concentrazioni di prova figurano la concentrazione dell'ambiente reale, nonché la concentrazione pertinente per l'argomento specifico della valutazione.

La o le concentrazioni della sostanza in esame devono essere inferiori al livello al quale producono effetti cronici o all'1 % della concentrazione LC_{50} acuta asintotica all'interno di un intervallo di interesse ambientale e superiori di almeno un ordine di grandezza al limite di quantificazione in acqua mediante il metodo analitico utilizzato. Il valore massimo ammissibile di concentrazione di prova può essere determinato anche dividendo la LC_{50} acuta (96 h) per un appropriato rapporto di concentrazione acuta/cronica (rapporti appropriati per alcuni prodotti chimici si situano intorno a 3, ma alcuni sono oltre 100). Se è utilizzata una seconda concentrazione, essa non deve differire dalla prima di un fattore dieci. Se ciò non è possibile in base al criterio di tossicità (che fissa un limite massimo per la concentrazione di prova) e al limite inferiore di determinazione analitica è opportuno applicare un fattore inferiore a 10 e utilizzare una sostanza radiomarcata, (della purezza più elevata, di preferenza superiore al 98 %). Occorre provvedere a che la concentrazione della sostanza in esame non superi la solubilità nel mezzo di prova.

Controlli

In aggiunta alle concentrazioni con la sostanza di prova, dovrebbe essere allestita una serie di controllo con l'acqua di diluizione o, se del caso, una serie di controllo contenente il solvente.

Frequenza delle misurazioni della qualità dell'acqua

Durante la prova, misurare l'ossigeno disciolto, il carbonio organico totale, il pH e la temperatura in tutte le vasche di prova e di controllo. La durezza totale e la salinità (se del caso) vanno misurate almeno nelle vasche di controllo e in una vasca di prova. Se due o più concentrazioni sono sottoposte a prova, misurare tali parametri alla concentrazione massima. Come minimo, l'ossigeno disciolto e, se del caso, la salinità devono essere misurati tre volte — all'inizio, verso la metà e alla fine del periodo di assorbimento — e una volta alla settimana durante il periodo di depurazione. Il TOC deve essere misurato all'inizio del saggio (24 h e 48 h prima dell'inizio della fase di assorbimento), prima dell'aggiunta del pesce e almeno una volta la settimana durante le fasi di assorbimento e depurazione. La temperatura va misurata e registrata giornalmente, il pH all'inizio e al termine di ciascun periodo e la durezza una volta per ogni prova. La temperatura dovrebbe preferibilmente essere controllata in continuo in almeno una vasca.

Campionamento e analisi dei pesci e dell'acqua

Programma di campionamento del pesce e dell'acqua

Per la determinazione della concentrazione della sostanza in esame, l'acqua delle vasche sperimentali deve essere campionata prima dell'aggiunta del pesce e durante le fasi di assorbimento e depurazione. L'acqua deve essere campionata contemporaneamente al campionamento del pesce e prima della somministrazione di cibo. Campionamenti più frequenti possono essere utili per garantire la stabilità delle concentrazioni dopo l'introduzione dei pesci. Occorre determinare le concentrazioni della sostanza in esame durante la fase di assorbimento al fine di verificare il rispetto dei criteri di validità (paragrafo 24). Se l'analisi dell'acqua prelevata all'inizio della fase di depurazione non rileva alcuna sostanza in esame, ciò potrebbe giustificare la sospensione della verifica della presenza di tale sostanza nell'acqua di prova e acqua di controllo per il resto della fase di eliminazione.

I pesci devono essere campionati almeno cinque volte durante la fase di assorbimento e almeno quattro volte durante la fase di depurazione per rilevare la sostanza in esame. Poiché in qualche caso risulterà difficile calcolare una stima ragionevolmente precisa del BCF sulla base di questo numero di campioni, in particolare quando la cinetica di depurazione non è una semplice cinetica di primo ordine, è consigliabile prelevare campioni a frequenza più elevata in tutti e due i periodi (cfr. appendice 4).

Il contenuto di lipidi e la concentrazione della sostanza in esame sono determinati sullo stesso materiale biologico almeno all'inizio e alla fine della fase di assorbimento e alla fine della fase di depurazione. Qualora ciò non fosse possibile, almeno tre esemplari dovranno essere campionati indipendentemente per determinare il contenuto lipidico in ciascuno dei medesimi tre punti di campionamento. Il numero di pesci per vasca all'inizio dell'esperimento dovrebbe essere adeguato di conseguenza ⁽¹⁾. In alternativa, se non sono rilevate quantità significative della sostanza in esame nei pesci di controllo (cioè i pesci dello stock di popolazione), i pesci di controllo della prova possono essere analizzati soltanto per il loro contenuto lipidico e l'analisi della sostanza in esame nel o nei gruppi di prova (nonché la costante cinetica di assorbimento, la costante cinetica di depurazione e valori del BCF) può essere corretta in funzione del contenuto lipidico del gruppo di controllo durante la prova ⁽²⁾.

Gli esemplari morti o malati non devono essere esaminati per la sostanza in esame o concentrazione lipidica.

L'appendice 4 presenta un esempio di un programma di campionamento accettabile. Si possono facilmente calcolare altri programmi se si usano altri valori di K_{ow} per calcolare il tempo di esposizione necessario per un assorbimento del 95 % (cfr. appendice 5).

Il campionamento va proseguito durante la fase di assorbimento fino al raggiungimento dello stato stazionario (cfr. appendice 1, Definizioni e unità di misure) o una volta terminata la fase di assorbimento (dopo 28 o 60 giorni, cfr. paragrafi 37 e 38). Prima dell'inizio della fase di depurazione, i pesci devono essere trasferiti in contenitori puliti.

Campionamento e preparazione del campione

I campioni d'acqua per l'analisi vengono ottenuti, per esempio, mediante sifonatura attraverso tubature inerti da un punto centrale della vasca sperimentale. Né la filtrazione né la centrifugazione sembrano separare sempre la frazione non-biodisponibile della sostanza in esame da quella biodisponibile. Nel caso si ricorra a una separazione, occorre giustificare tale tecnica o fornirne una validazione nel verbale di prova, tenuto conto delle difficoltà di biodisponibilità (25). In particolare le sostanze fortemente idrofobe (ossia le sostanze il cui $\log K_{ow} > 5$) (12) (26), per le quali può verificarsi un adsorbimento alla matrice del filtro o ai recipienti di centrifugazione, non sono soggette a tali trattamenti. Vanno, invece, adottate le misure atte a mantenere le vasche più pulite possibile (cfr. paragrafo 46) e controllare il contenuto di carbonio organico totale durante le fasi di assorbimento e depurazione (cfr. paragrafo 53). Per evitare i problemi dovuti alla riduzione della biodisponibilità, si possono eseguire, per le sostanze scarsamente solubili e fortemente idrofobe, campionamenti mediante tecniche di microestrazione in fase solida.

⁽¹⁾ Se il tenore di lipidi e la sostanza in esame non sono analizzati nello stesso pesce, i pesci devono almeno avere peso analogo ed essere (se del caso) dello stesso sesso.

⁽²⁾ Questa alternativa è valida solo se i pesci in tutti i gruppi di prova sono mantenute in gruppi con dimensioni analoghe, i pesci sono rimossi secondo lo stesso modello e alimentati allo stesso modo. Ciò garantisce che una crescita analoga dei pesci in tutti i gruppi di prova, se la concentrazione è inferiore all'intervallo di tossicità. Se il tasso di crescita è simile, anche il contenuto lipidico dovrebbe essere simile. Una crescita diversa nel gruppo di controllo può indicare un effetto della sostanza e vanificherebbe lo studio.

I pesci campionati devono essere soppressi immediatamente con metodi non cruenti, utilizzando il metodo più appropriato e meno crudele (per i pesci interi, procedendo unicamente a risciacquarli in acqua (cfr. paragrafo 28) e asciugarli tamponando con carta assorbente). Pesare e misurare la lunghezza totale ⁽¹⁾. Per ogni singolo pesce, il peso e la lunghezza misurati sono correlati alla concentrazione chimica esaminata (e se del caso al contenuto di grassi), ad esempio assegnando un codice di identificazione univoco per ciascun pesce.

È preferibile analizzare il pesce e l'acqua immediatamente dopo il campionamento allo scopo di evitare degradazione o altre perdite e calcolare costanti approssimative della velocità di assorbimento e depurazione nel corso della prova. L'analisi immediata consente inoltre di individuare rapidamente l'inizio di una fase di stato stazionario.

In mancanza di un'analisi immediata, tutti i campioni vanno conservati con un metodo appropriato. Prima di iniziare lo studio è opportuno ottenere informazioni sul metodo appropriato di conservazione della particolare sostanza in esame — ad esempio il congelamento, la conservazione a 4 °C, l'estrazione ecc. La durata della conservazione va scelta in modo da garantire che la sostanza non si degradi durante la stessa.

Qualità del metodo analitico

Poiché tutta la procedura è basata sostanzialmente sull'accuratezza, la precisione e la sensibilità del metodo analitico utilizzato per la sostanza in esame, controllare sperimentalmente che l'accuratezza, la precisione e la riproducibilità dell'analisi della sostanza, nonché il recupero della sostanza in esame dall'acqua e dal pesce, siano soddisfacenti per quel particolare metodo. Tali verifiche si effettuano nel corso delle prove preliminari. Occorre inoltre controllare che la sostanza in esame non sia rilevabile nell'acqua di diluizione usata. Se necessario, correggere i valori di concentrazione della sostanza in esame nell'acqua e nei pesci in funzione dei valori ottenuti nella prova per il recupero della sostanza in esame e la sua concentrazione naturale nei controlli. Manipolare sempre i campioni di pesce e acqua in modo da minimizzare la contaminazione e le perdite (per esempio per assorbimento sul dispositivo di campionamento).

Analisi dei campioni di pesce

Se nella prova vengono usati materiali radiomarcanti, è possibile analizzare il marcatore radioattivo totale (cioè progenitore e metaboliti), oppure i campioni possono venire depurati, così da poter analizzare la sostanza madre separatamente. Se il BCF deve basarsi sulla sostanza madre, i principali metaboliti sono caratterizzati, almeno alla fine della fase di assorbimento (cfr. paragrafo 6). I principali metaboliti sono quelli che rappresentano almeno ≥ 10 % dei residui totali nei tessuti del pesce, quelli che rappresentano ≥ 5 % in due tempi consecutivi di campionamento, che aumentano i livelli durante la fase di assorbimento, infine, quelli di rilevanza tossicologica. Se il BCF per l'intero pesce in termini di residui totali con marcatura radioattiva è ≥ 500 , può essere consigliabile, anche fortemente raccomandato nel caso di talune categorie di sostanze chimiche come i pesticidi, individuare e quantificare i principali metaboliti. La quantificazione di tali metaboliti può essere richiesta da alcune autorità di regolamentazione. Se si identificano e quantificano prodotti di degradazione che rappresentano ≥ 10 % dei residui totali con marcatura radioattiva nei tessuti del pesce, si raccomanda di identificarli e quantificarli anche nell'acqua di prova. Se ciò non fosse possibile, va spiegato nella relazione.

La concentrazione della sostanza in esame viene di solito determinata su ciascun pesce pesato. Se ciò non è possibile, si possono raggruppare i campioni in occasione di ciascun campionamento, ma, poiché tale operazione limita il trattamento statistico dei risultati, è pertanto opportuno includere un numero sufficiente di pesci nella prova per tener conto del raggruppamento, della procedura statistica e della potenza desiderati. I riferimenti (27) e (28) possono essere utilizzati per l'introduzione alle pertinenti procedure di raggruppamento dei campioni.

⁽¹⁾ Oltre al peso, va registrata la lunghezza totale perché il confronto tra le entità di aumento della lunghezza durante la prova è un buon indicatore per stabilire se si sia verificato un effetto negativo.

Il BCF va espresso in modo normalizzato in funzione di un pesce con un contenuto di grassi del 5 % (in relazione al peso umido) in aggiunta al BCF ottenuto direttamente dalla prova (cfr. paragrafo 21), a meno che non si possa dimostrare che la sostanza in esame non si accumula principalmente nei grassi. Occorre, se possibile, determinare il contenuto lipidico dei pesci a ciascun campionamento, di preferenza a partire dallo stesso estratto prodotto per l'analisi della sostanza in esame, perché i lipidi devono spesso venire rimossi dall'estratto prima di poterlo analizzare per via cromatografica. Tuttavia, l'analisi delle sostanze in esame richiede spesso specifiche procedure di estrazione che potrebbero essere in contraddizione con i metodi di prova per la determinazione dei lipidi. In questo caso (finché non siano disponibili idonei metodi strumentali non distruttivi), si raccomanda di impiegare una strategia differente per determinare il contenuto di lipidi del pesce (cfr. paragrafo 56). Si devono usare metodi adatti per la determinazione del contenuto lipidico (20). Si raccomanda la tecnica di estrazione cloroformio/metanolo (29) come metodo standard (30), ma anche il metodo Smedes (31) può essere utilizzato in alternativa. Quest'ultimo metodo è caratterizzato da efficienza di estrazione, alta precisione, uso di solventi organici meno tossici e facilità di esecuzione. Altri metodi di precisione comparabili ai metodi raccomandati potrebbero essere utilizzati a condizione di giustificarne adeguatamente la scelta. È importante fornire informazioni dettagliate sulla metodologia applicata.

Misurazione della crescita dei pesci

All'inizio della prova, pesare individualmente e misurare la lunghezza di 5-10 pesci dello stock. Può trattarsi degli stessi pesci utilizzati per l'analisi dei lipidi (cfr. paragrafo 56). Misurare il peso e la lunghezza dei pesci appartenenti ai gruppi di controllo e di prova utilizzati per ogni campionamento prima di procedere all'analisi chimica o dei lipidi. La misurazione di questi pesci campionati può essere usata per calcolare il peso e la lunghezza dei pesci rimasti nelle vasche di prova e di controllo (cfr. paragrafo 45).

DATI E RELAZIONE

Trattamento dei risultati

La curva di assorbimento della sostanza in esame è ottenuta riportando graficamente la sua concentrazione nel/sul pesce (o tessuti specificati) durante la fase di assorbimento in funzione del tempo su scale aritmetiche. Se la curva ha raggiunto un andamento costante, cioè è diventata approssimativamente asintotica rispetto all'asse del tempo, il fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario (BCF_{ss}) è calcolato secondo la formula seguente:

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

Lo sviluppo di C_f può essere influenzato dalla crescita dei pesci (cfr. paragrafi 72 e 73). La concentrazione media di esposizione (C_w) è influenzata da variazioni nel tempo. Si può prevedere che una concentrazione media ponderata nel tempo sia più pertinente e precisa per studi di bioaccumulo, anche se la variazione si mantiene all'interno del pertinente intervallo di validità (cfr. paragrafo 24). La media ponderata per il tempo della concentrazione in acqua può essere calcolata seguendo le istruzioni di cui all'appendice 5, sezione 1.

Il fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_k) è determinato come il rapporto k_1/k_2 , le due costanti cinetiche di primo ordine. Le costanti cinetiche k_1 e k_2 e il BCF_k possono essere ottenuti adattando simultaneamente la fase di assorbimento e quella di depurazione. Un'altra soluzione consiste nel determinare k_1 e k_2 in sequenza (cfr. l'appendice 5 per una descrizione e un raffronto di questi metodi). La costante cinetica di depurazione (k_2) può essere corretta dall'effetto di diluizione dovuta alla crescita (cfr. paragrafi 72 e 73). Se è evidente che la curva di assorbimento e/o depurazione non è di primo ordine, bisogna allora impiegare modelli più complessi (cfr. bibliografia dell'appendice 5) con l'assistenza di un esperto in biostatistica e/o farmacocinetica.

Dati relativi al peso/alla lunghezza dei pesci

Il peso umido e la lunghezza totale di ogni esemplare, a ciascun tempo di campionamento, sono riportati separatamente per i gruppi di prova e di controllo durante le fasi di assorbimento e di depurazione (compreso lo stock ittico all'inizio del periodo di assorbimento). Per ogni singolo pesce, il peso e la lunghezza sono collegati alla concentrazione chimica analizzata, ad esempio dotando ciascun pesce di un codice d'identificazione univoco. Il peso è il parametro più indicato per la misurazione della crescita al fine di correggere i valori del BCF cinetico dall'effetto di diluizione dovuta alla crescita. Il paragrafo 73 e l'appendice 5 presentano il metodo utilizzato per la correzione dall'effetto di diluizione dovuta alla crescita.

Correzione dall'effetto di diluizione dovuta alla crescita e normalizzazione dei lipidi

La crescita del pesce durante la fase di depurazione può ridurre le concentrazioni della sostanza chimica misurate nel pesce, con la conseguenza che, nel complesso, la costante cinetica di depurazione (k_2) è di fatto maggiore rispetto a quanto si otterrebbe dai soli processi di depurazione (ad esempio respirazione, metabolismo, egestione). I fattori di bioconcentrazione cinetici sono corretti dall'effetto di diluizione dovuta alla crescita. Il BCF_{SS} è influenzato anche dalla crescita, ma non esiste una procedura di correzione concordata in materia. In caso di forte crescita, deve essere calcolato anche il BCF_k , corretto dall'effetto della crescita (BCF_{kg}), perché può risultare più pertinente del fattore di bioconcentrazione. Il contenuto di liquidi nel pesce sottoposto a trattamento (fortemente associato al bioaccumulo delle sostanze idrofobe) può variare sufficientemente in pratica perché sia necessaria la normalizzazione sulla base di un tasso di lipidi predefinito (5 % del peso umido) al fine di ottenere significativi fattori di bioconcentrazione cinetico e allo stato stazionario — a meno che non sia possibile dimostrare che la sostanza non si accumula principalmente nei grassi (ad esempio alcune sostanze perfluorurate possono legarsi alle proteine). Le equazioni ed esempi per questi calcoli figurano nell'appendice 5.

Per correggere un BCF cinetico dall'effetto di diluizione dovuta alla crescita, la costante cinetica di depurazione deve essere corretta per la crescita. La costante cinetica di depurazione corretta per la crescita (k_{2g}) è calcolata sottraendo il tasso di crescita costante (k_g , ricavato dai dati relativi al peso misurato) dalla complessiva costante cinetica di depurazione (k_2). Il fattore di bioconcentrazione cinetico corretto per la crescita è calcolato dividendo la costante cinetica di assorbimento (k_1), la costante cinetica di depurazione corretta per la crescita (k_{2g}) (cfr. appendice 5). In alcuni casi questo metodo è inadeguato. Ad esempio, per sostanze a depurazione molto lenta saggiate in pesci in rapida crescita, il k_{2g} derivato può essere molto piccolo e quindi l'errore nelle due costanti cinetiche utilizzate per determinarlo è cruciale, e in alcuni casi le stime di k_g possono essere superiori a k_2 . Un approccio alternativo che evita la necessità di correzione dall'effetto di diluizione dovuto alla crescita comporta l'utilizzo dei dati di depurazione relativi alla massa della sostanza in esame per pesce (pesci interi), invece dei dati (concentrazione) relativi alla massa normale della sostanza in esame per unità di massa del pesce. Tale calcolo è facilmente ottenibile dato che le prove eseguite conformemente al presente metodo di prova dovrebbero collegare le concentrazioni registrate di tessuto al peso dei singoli pesci. La semplice procedura da seguire è descritta nell'appendice 5. Si noti che k_2 deve essere comunque registrato, anche se si applica questo metodo alternativo.

I fattori di bioconcentrazione cinetico e allo stato stazionario vanno registrati anche rispetto ad un contenuto standard di lipidi del pesce (5 % p/p), a meno che si possa sostenere che la sostanza in esame non si accumula principalmente nei grassi. I dati relativi alla concentrazione nel pesce, o il BCF, sono normalizzati in base al rapporto tra il 5 % e l'effettivo contenuto (individuale) di lipidi (in % di peso umido) (cfr. appendice 5).

Se l'analisi chimica e l'analisi dei lipidi sono state condotte sullo stesso pesce, si devono utilizzare i dati normalizzati relativi ai lipidi del singolo pesce ai fini del calcolo del BCF normalizzato in funzione dei lipidi. In alternativa, se il tasso di crescita è simile nei gruppi esposti e dei gruppi di controllo, si può utilizzare soltanto il contenuto lipidico dei pesci di controllo per la correzione dei lipidi (cfr. paragrafo 56). Un metodo di calcolo del BCF normalizzato è descritto nell'appendice 5.

Interpretazione dei risultati

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

Per escludere effetti tossici, in linea di principio la crescita media sia del gruppo di prova sia del gruppo di controllo non dovrebbe essere significativamente diversa. Le costanti del tasso di crescita o le curve di crescita dei due gruppi vanno confrontate mediante appropriata procedura ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Può essere effettuato un test t sulle costanti del tasso di crescita, per verificare se la crescita varia tra gruppi di controllo e di prova, o un test F nel caso di analisi della varianza. Se necessario, un test F o del rapporto di verosimiglianza può essere utilizzato come ausilio per la scelta del modello di crescita (monografia 54 dell'OCSE (32)).

Curve di assorbimento e depurazione chiaramente definite sono un'indicazione della buona qualità dei dati di bioconcentrazione. Per le costanti cinetiche, il risultato del test della bontà di adattamento χ^2 dovrebbe mostrare un buon adattamento (ossia una bassa percentuale di errore nelle misurazioni (32)) per il modello di bioaccumulo, affinché le costanti cinetiche possano essere considerate attendibili (cfr. appendice 5). Se si utilizza più di una concentrazione di prova, la variazione nelle costanti di assorbimento/depurazione tra le concentrazioni di prova deve essere minore del 20 % ⁽¹⁾. In caso contrario, ciò potrebbe indicare una dipendenza dalla concentrazione. Se si osservano differenze significative nelle velocità di assorbimento/depurazione tra le concentrazioni di prova applicate, registrarle e fornire una possibile spiegazione. In generale, un intervallo di confidenza al 95 % del BCF negli studi ben impostati è vicino a ± 20 % del BCF ottenuto.

Se si saggiano due o più concentrazioni, i risultati di entrambe o tutte le concentrazioni sono utilizzati per esaminare la coerenza dei risultati e per mettere in evidenza un'eventuale dipendenza dalla concentrazione. Se si utilizza una sola concentrazione per ridurre il numero di animali e/o le risorse impiegate, occorre giustificare tale scelta.

Il BCF_{ss} è incerto se il BCF_k è significativamente più grande del BCF_{ss} , poiché ciò può indicare che lo stato stazionario non è stato raggiunto o che la diluizione dovuta alla crescita e i processi di perdita non sono stati presi in considerazione. Nei casi in cui il BCF_{ss} è molto più elevato del BCF_k , è necessario verificare la presenza di possibili errori e calcolare nuovamente le costanti cinetiche di assorbimento e depurazione. Una diversa procedura di adattamento potrebbe migliorare la stima del BCF_k (cfr. appendice 5).

Relazione sulla prova

Oltre alle informazioni di cui al paragrafo 3, la relazione comprende i dati seguenti:

Sostanza in esame:

Natura fisica e, se del caso, proprietà fisicochimiche

- identità chimica, ad esempio nome CAS/IUPAC, numero CAS, codice MILES or InChI, formula di struttura, purezza, identità chimica delle impurità se possibile e fattibile in pratica, ecc. (compreso il contenuto di carbonio organico, se del caso).
- Per sostanze multi-componenti e UVCB (sostanze di composizione sconosciuta o variabile, prodotti di una reazione complessa o materiali biologici) occorre descrivere con la massima precisione possibile l'identità chimica dei diversi componenti e individuare per ciascuno quale percentuale della massa totale della sostanza rappresenta. Spiegare brevemente in che modo il metodo analitico utilizzato consente di misurare la concentrazione della sostanza, e descrivere tutte le procedure di valutazione, indicando in particolare il grado di precisione del metodo, il limite di rilevabilità e il limite di quantificazione.
- Nel caso di sostanza radiomarcata, la posizione precisa dell'atomo o degli atomi marcati e la percentuale di radioattività associata ad impurezze.
- Informazioni sulla tossicità della sostanza in esame per il pesce (idealmente la specie utilizzata). La tossicità è riportata sotto forma di LC_{50} acuta (96 h) e NOAEL e LOAEL tratti da uno studio cronico (ad esempio, un test eseguito nelle prime fasi di vita o un test sull'intero ciclo di vita, se disponibile).
- Le condizioni di conservazione del prodotto o della sostanza chimica in esame e, se del caso, stabilità dello stesso in condizioni di conservazione, se ciò avviene prima dell'utilizzo.

Specie sperimentali:

Nome scientifico, ceppo, provenienza, eventuali pretrattamenti, acclimatazione, età, sesso (se del caso), dimensioni, peso e lunghezza, ecc.)

⁽¹⁾ Tali percentuali presuppongono che i metodi analitici sono affidabili e che il tempo di dimezzamento è < 14 giorni. Se i metodi d'analisi sono meno affidabili o il dimezzamento è (molto) maggiore questi numeri saranno più elevati.

Condizioni sperimentali:

- Procedura di saggio usata (per esempio a flusso continuo o semistatica); studio completo o ridotto (compresi criteri e giustificazione).
- Tipo e caratteristiche dell'illuminazione usata e fotoperiodi.
- Disegno sperimentale (ad esempio numero e dimensioni delle vasche sperimentali, tasso di sostituzione del volume d'acqua, tasso di carico, numero di repliche, numero di pesci per campione, numero delle concentrazioni di prova, durata delle fasi di assorbimento e depurazione, frequenza di campionamento per i campioni di pesce e di acqua).
- Metodo di preparazione delle soluzioni madre e frequenza di rinnovo (indicare il solvente, la sua concentrazione e il suo contributo al contenuto di carbonio organico dell'acqua) o descrizione del sistema di somministrazione alternativo.
- Concentrazioni nominali nella prova, medie dei valori misurati e loro deviazioni standard nelle vasche di saggio, e metodo e frequenza con cui sono ottenuti questi valori.
- Origine dell'acqua di diluizione, descrizione degli eventuali pretrattamenti, risultati di eventuali dimostrazioni della capacità del pesce sperimentale di vivere nell'acqua, e caratteristiche dell'acqua: pH, durezza, temperatura, concentrazione di ossigeno disciolto, livelli di cloro residuo (se misurati), carbonio organico totale, solidi sospesi, salinità del mezzo di prova (se misurato) ed eventuali altre misurazioni effettuate.
- Qualità dell'acqua all'interno delle vasche sperimentali, pH, durezza, TOC, temperatura e concentrazione dell'ossigeno disciolto; modalità e frequenza delle misurazioni.
- Informazioni dettagliate sull'alimentazione (ad esempio tipo/i di mangime, origine, composizione (se possibile indicare almeno il tenore lipidico e proteico), tasso di alimentazione selezionato, quantità somministrata e frequenza;
- Informazioni sul trattamento dei campioni di pesce e d'acqua, inclusi dettagli di preparazione, conservazione, estrazione e procedure analitiche (e loro precisione) per la sostanza in esame e il contenuto di lipidi.
- I metodi utilizzati di randomizzazione del trattamento e l'assegnazione dei pesci nelle vasche sperimentali.
- Data dell'introduzione degli organismi sperimentali nelle soluzioni di prova e durata della prova.
- Descrizione delle prove eseguite per determinare l'intervallo e i risultati, se disponibili.

Risultati:

- Risultati di eventuali studi preliminari eseguiti.
- Mortalità dei pesci di controllo e dei pesci trattati ed eventuale comportamento anomalo osservato.
- Informazioni su eventuali effetti nocivi osservati.
- Descrizione completa di tutte le procedure di analisi chimiche utilizzate, compresi i limiti di rilevabilità e di quantificazione, la variabilità e il recupero.
- Contenuto di lipidi del pesce, compreso il metodo utilizzato e, se derivato, fattore di normalizzazione dei lipidi (L_n , fattore per esprimere i risultati relativi a un contenuto lipidico del pesce del 5 %).
- Tabella dei dati relativi al peso (e alla lunghezza), riferiti alle concentrazioni chimiche (e al contenuto di grassi, ove necessario) di ciascun pesce dei gruppi di controllo e di trattamento (ad esempio attribuendo un identificatore unico a ciascun pesce campionato) e calcoli per la o le costanti cinetiche di crescita ottenute.
- Tabella dei dati relativi alle concentrazioni della sostanza in esame nei pesci (C_p , riferiti a singoli pesci) e nell'acqua (C_w) (con valori medi per gruppo di prova e di controllo, deviazione standard e intervallo, se del caso) per tutti i tempi di campionamento [C_f espresso in mg/kg di peso umido del corpo intero o dei suoi tessuti specificati, per esempio lipidi, e C_w in mg/l). Valori di C_w per la serie di controllo (riportare anche il valore della concentrazione di fondo).

- Curve (con tutti i dati misurati), recanti le seguenti indicazioni (se del caso, le concentrazioni possono essere espresse in relazione al corpo intero e al contenuto di lipidi normalizzato al 5 % dell'animale o di suoi tessuti specificati):
 - la crescita, ossia il peso del pesce in funzione del tempo o logaritmo naturale del peso in funzione del tempo (compresa la costante cinetica di crescita, k_g);
 - l'assorbimento e la depurazione della sostanza in esame nel pesce (su un grafico);
 - tempo di raggiungimento dello stato stazionario (se realizzato);
 - logaritmo naturale della concentrazione in funzione del tempo di assorbimento (compresa la costante cinetica di assorbimento ottenuta k_1);
 - logaritmo naturale della concentrazione in funzione del tempo di depurazione (compresa la costante cinetica di depurazione ottenuta k_2); nonché
 - le curve delle fasi di assorbimento e depurazione, con indicazione dei dati e del modello adattato.
- Se l'esame visivo di un grafico presenta evidenti valori anomali, è possibile applicare un test statisticamente valido ai valori anomali per eliminare i dati corrispondenti e fornire una giustificazione documentata a sostegno di tale scelta.
- Il fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario (BCF_{ss}), se lo stato stazionario è (quasi) raggiunto.
- Il fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_k) e costanti cinetiche di assorbimento e depurazione ottenute k_1 e k_2 , assieme alle varianze in k_2 (pendenza e intercetta) se si utilizza un adattamento sequenziale.
- Intervalli di confidenza, deviazione standard (se disponibili) e metodi di calcolo o analisi dei dati per ciascun parametro per ciascuna concentrazione della sostanza in esame usata.
 - Informazioni relative a eventuali metaboliti della sostanza in esame radiomarcata e il loro accumulo.
 - Costante cinetica di crescita (con intervallo di confidenza del 95 %) e costante cinetica di depurazione calcolata corretta per la crescita (k_{2g}), il tempo di dimezzamento e il BCF (BCF_{kg}).
 - Qualsiasi osservazione insolita registrata durante la prova, eventuali deviazioni dalle procedure e qualsiasi altra informazione pertinente.
- Una tabella riepilogativa dei pertinenti dati misurati e calcolati, come:

Costanti cinetiche di assorbimento e depurazione della sostanza e fattori di bioconcentrazione (BCF)	
k_g (costante cinetica di crescita; giorno^{-1}):	Inserire il valore (95 % CI) ⁽¹⁾
k_1 (costante cinetica di assorbimento globale; $\text{kg}^{-1} \text{giorno}^{-1}$):	Inserire il valore (95 % CI) ⁽¹⁾
k_2 (costante cinetica di depurazione globale; giorno^{-1}):	Inserire il valore (95 % CI) ⁽¹⁾
k_{2g} (costante cinetica di depurazione corretta per la crescita; giorno^{-1}):	Inserire il valore (95 % CI) ⁽¹⁾
C_f (concentrazione della sostanza nel pesce allo stato stazionario; mg kg^{-1}):	Inserire il valore \pm SD ⁽²⁾
C_w (concentrazione della sostanza in acqua; mg/l):	Inserire il valore \pm SD ⁽²⁾
L_n (fattore di normalizzazione dei lipidi):	Inserire il valore ⁽³⁾

Costanti cinetiche di assorbimento e depurazione della sostanza e fattori di bioconcentrazione (BCF)	
BCF _{SS} (fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario; l kg ⁻¹)	Inserire il valore ± SD ⁽²⁾
BCF _{SSL} (fattore normalizzato di bioconcentrazione dei lipidi allo stato stazionario; l kg ⁻¹):	Inserire il valore ⁽³⁾ ± SD ⁽²⁾
BCF _K (fattore di bioconcentrazione cinetico; l kg ⁻¹)	Inserire il valore (95 % CI) ⁽¹⁾
BCF _{Kg} (fattore di bioconcentrazione cinetico corretto per la crescita; l kg ⁻¹)	Inserire il valore (95 % CI) ⁽¹⁾
t _{1/2g} (tempo di dimezzamento corretto per la crescita; giorno):	Inserire il valore (95 % CI) ⁽¹⁾
BCF _{KL} (fattore di bioconcentrazione cinetico normalizzato in funzione dei lipidi; l kg ⁻¹):	Inserire il valore
BCF _{KLg} (fattore di bioconcentrazione corretto per la crescita normalizzato in funzione dei lipidi; l kg ⁻¹):	Inserire il valore

⁽¹⁾ CI: Intervallo di confidenza (se possibile stimarlo)
⁽²⁾ SD: Deviazione standard (se possibile stimarla)

Evitare risultati registrati come «non rilevato/quantificato a questo limite di rilevazione/quantificazione» mediante lo sviluppo di un metodo e di un protocollo sperimentale preliminari, perché tali risultati non possono essere utilizzati per il calcolo delle costanti cinetiche.

C.13 — II Prova ridotta di esposizione dei pesci attraverso l'ambiente acquatico

INTRODUZIONE

La crescente esperienza acquisita nella conduzione e nell'interpretazione della prova completa, sia in laboratorio sia da parte degli organismi di regolamentazione, dimostra che, con poche eccezioni, è applicabile la cinetica di primo ordine per calcolare le costanti cinetiche di assorbimento e depurazione. Pertanto, è possibile stimare le costanti cinetiche di assorbimento e depurazione con un minimo di punti di campionamento e ottenere il BCF cinetico.

Lo scopo iniziale di esaminare disegni sperimentali alternativi per lo studio del BCF consisteva nello sviluppare una prova ridotta da applicare in una fase di prova intermedia al fine di confutare o confermare le stime del BCF basate su valori K_{ow} e QSAR, ed eliminare in tal modo la necessità di eseguire uno studio completo per molte sostanze, e anche per minimizzare i costi e il numero di animali utilizzati, riducendo i campionamenti e le sequenze analitiche effettuate. Pur seguendo il principale disegno del precedente metodo di prova per consentire l'integrazione dei risultati della sperimentazione con i dati esistenti relativi al BCF e per facilitare l'esecuzione di prove e interpretazione dei dati, l'obiettivo consisteva nel fornire stime del BCF sufficientemente accurate e precise per valutare i rischi e adottare le decisioni pertinenti. Valgono molte delle considerazioni fatte per la prova completa, ad esempio i criteri di validità (cfr. paragrafo 24) e quelli per porre fine ad una prova se l'assorbimento riscontrato è trascurabile al termine della fase di assorbimento (cfr. paragrafi 16 e 38).

Le sostanze che si prestano a questo disegno sperimentale ridotto devono essere pertinenti per il settore generale per il quale il presente metodo di prova è stato elaborato, vale a dire le sostanze organiche non polari (cfr. paragrafo 49). Qualora risulti che la sostanza in esame si comporta diversamente (se ad esempio presenta una chiara deviazione dalla cinetica di primo ordine), è opportuno effettuare, a fini regolamentari, una prova completa.

In genere, la prova ridotta non si esegue su un periodo sperimentale più breve rispetto alla prova standard del BCF, ma richiede un ridotto campionamento dei pesci (cfr. l'appendice 6 per una spiegazione). Tuttavia, il periodo di depurazione può essere ridotto per le sostanze a depurazione rapida in modo da evitare che le concentrazioni nel pesce scendano al di sotto del limite di rilevazione/quantificazione prima della fine della prova. Una prova ridotta di esposizione attraverso l'ambiente acquatico con un'unica concentrazione può servire a determinare se è necessario condurre una verifica completa, e se i dati utilizzati per calcolare le costanti cinetiche e il BCF sono affidabili (cfr. paragrafo 93), la prova completa può essere omessa a condizione che il BCF ottenuto sia lontano dai valori regolamentari che destano preoccupazione.

In alcuni casi può essere utile eseguire la prova con più di una concentrazione di prova, come prova preliminare per determinare se le stime del fattore di bioconcentrazione (BCF) per una sostanza chimica sono dipendenti dalla concentrazione. Se sulla base della prova ridotta le stime del BCF risultano dipendenti dalla concentrazione, è necessario eseguire una prova completa. Se, invece, sulla base di una prova ridotta, le stime del BCF risultano indipendenti dalla concentrazione, ma i risultati non sono considerati definitivi, qualsiasi ulteriore prova completa può essere effettuata con un'unica concentrazione, riducendo in tal modo il numero degli animali utilizzati rispetto a una prova completa con due (o più) concentrazioni.

Le sostanze potenzialmente ammissibili alla prova ridotta devono:

- poter presentare cinetiche approssimative di assorbimento e di eliminazione di primo ordine, ottenute per esempio mediante riferimenti incrociati con sostanze simili;
- presentare un $\log K_{ow} < 6$, a meno che non sia previsto un rapido metabolismo; ⁽¹⁾
- essere sufficientemente solubili in acqua per la tecnica analitica utilizzata (cfr. paragrafo 24);
- essere chiaramente quantificabili (ad esempio le concentrazioni dovrebbero essere almeno di un ordine di grandezza superiori al limite di quantificazione), sia nei pesci che nell'acqua; è raccomandata una radiomarcatura (cfr. paragrafo 23); e
- avere un periodo di depurazione superiore al tempo di dimezzamento previsto (per i calcoli cfr. appendice 5) oppure la durata di depurazione va adeguata di conseguenza (cfr. paragrafo 91). Un'eccezione a questa regola è ammessa qualora sia previsto un metabolismo rapido della sostanza.

PROGRAMMA DI CAMPIONAMENTO PER GLI STUDI ESEGUITI IN BASE AL DISEGNO SPERIMENTALE RIDOTTO

Campionamento del pesce

Il campionamento dei pesci è ridotto a quattro tempi di campionamento:

- A metà e alla fine della fase di assorbimento (l'ultimo prelievo segna l'inizio della fase di depurazione) ad es. dopo 14 e 28 giorni (33).
- A metà della fase di depurazione e a conclusione dello studio (se la concentrazione della sostanza è $< 10\%$ della concentrazione massima, o quando sia chiaramente superato un tempo di dimezzamento della sostanza), ad esempio dopo 7 e 14 giorni di depurazione (33). Se è prevista o riscontrata una depurazione rapida, può essere necessario abbreviare il periodo di depurazione per evitare che le concentrazioni nel pesce scendano al di sotto del limite di quantificazione.
- Misurazione del contenuto di grassi come nella prova completa.
- Correzione della crescita come nella prova completa.
- Il BCF è calcolato come fattore di bioconcentrazione cinetico.

Campionamento dell'acqua

Nella prova ridotta, l'acqua viene prelevata come nella prova completa (cfr. paragrafo 54) o almeno cinque volte ad intervalli regolari durante la fase di assorbimento e una volta alla settimana durante la fase di depurazione.

⁽¹⁾ La prova ridotta può infatti essere utilizzata per dimostrare un metabolismo rapido, quando è noto che un metabolismo rapido è probabile.

Modifiche del disegno sperimentale

In funzione delle proprietà della sostanza in esame, della validità delle previsioni QSAR e delle specifiche finalità dello studio, possono essere prese in considerazione alcune modifiche nel disegno sperimentale.

- Se è necessaria una maggior precisione, è possibile utilizzare più pesci (6 o 8 invece di 4) al momento del campionamento al termine della fase di assorbimento.
- Si includerà un altro gruppo di pesci se dopo 14 giorni (o al termine della durata prevista della fase di depurazione) la depurazione non è sufficiente (> 50 %). Se la durata prevista della fase di depurazione è inferiore o superiore a 14 giorni, è opportuno adeguare il programma di campionamento (un gruppo di pesci al termine della fase di depurazione, e un gruppo alla metà di tale fase).
- Si devono usare due concentrazioni di prova per esaminare la possibile dipendenza dalla concentrazione. Se i risultati della prova ridotta, con due concentrazioni di esposizione, dimostrano che il BCF è indipendente dalla concentrazione (differenza inferiore al 20 %), si potrà ritenere che una concentrazione di esposizione sia sufficiente in caso di eventuale prova completa.
- È probabile che i modelli di processi di bioaccumulo come quelli proposti da *Arnot et al.* (35) possano contribuire a prevedere la durata delle fasi di assorbimento e di depurazione (cfr. anche appendice 5).

Calcoli

Il motivo di questa impostazione è che il fattore di bioconcentrazione in una prova completa può essere determinato come fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario (BCF_{ss}) calcolando il rapporto tra la concentrazione della sostanza in esame nei tessuti del pesce e la concentrazione della sostanza in esame nell'acqua, o calcolando il fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_k), vale a dire il rapporto tra la costante cinetica di assorbimento k_1 e la costante cinetica di depurazione k_2 . Il BCF_k sarebbe valido anche se una concentrazione di una sostanza allo stato stazionario non è raggiunta durante l'assorbimento, a condizione che l'assorbimento e la depurazione seguano essenzialmente processi cinetici di primo ordine. Almeno due punti sono necessari per stimare le costanti cinetiche di assorbimento e di depurazione, alla fine della fase di assorbimento (ossia all'inizio della fase di depurazione) e l'altro alla fine della fase di depurazione (o in uno stadio avanzato della fase di depurazione). Il punto di campionamento intermedio è raccomandato per controllare le cinetiche di assorbimento e di depurazione ⁽¹⁾. Per i calcoli, cfr. le appendici 5 e 6.

Interpretazione dei risultati

Per valutare la validità e il valore informativo della prova, occorre verificare che il periodo di depurazione sia superiore a un tempo di dimezzamento. Analogamente, si confronta il BCF_{km} (BCF cinetico ottenuto da una prova ridotta) con il valore del BCF_{ss} ridotto (che corrisponde al BCF_{ss} calcolato alla fine della fase di assorbimento, supponendo che sia stato raggiunto lo stato stazionario. Ciò può essere solo presunto, in quanto il numero di punti di campionamento non è sufficiente a dimostrarlo). Se il $BCF_{km} < BCF_{ss}$ ridotto, quest'ultimo sarà il valore da privilegiare. Se BCF_{km} è inferiore al 70 % del BCF_{ss} ridotto, i risultati non sono validi, e occorre eseguire una prova completa.

Se la prova ridotta dà un BCF_{km} che si colloca nell'intervallo di qualsiasi valore che desta preoccupazione in base alla regolamentazione, dovrà essere eseguita una prova completa. Se il risultato è lontano da qualunque valore regolamentare preoccupante (nettamente superiore o inferiore), una prova completa può non essere necessaria, o si potrà effettuare uno studio completo con un'unica concentrazione se richiesto dal pertinente quadro normativo.

Se al termine di una prova ridotta con un'unica concentrazione risulta necessario eseguire una prova completa, questa potrà essere eseguita con una seconda concentrazione. Se i risultati corrispondono, si potrà fare a meno di una prova completa con una concentrazione diversa, poiché la bioconcentrazione della sostanza non dovrebbe dipendere dalla concentrazione. Se la prova ridotta è stata eseguita con due concentrazioni e i risultati non mostrano una dipendenza dalla concentrazione, si può eseguire la prova completa con un'unica concentrazione (cfr. paragrafo 87)

⁽¹⁾ Se sono misurati solo due dati, è possibile ottenere stime degli intervalli di confidenza per il BCF_{km} mediante una tecnica di bootstrap. Quando sono disponibili anche valori intermedi è possibile calcolare anche gli intervalli di confidenza per il BCF_{km} come nella prova completa.

Relazione sulla prova

La relazione della prova ridotta comprende tutte le informazioni richieste per la prova completa (cfr. paragrafo 81), a eccezione di quelle che non è possibile ottenere (vale a dire la curva indicante il rapporto tempo/stato stazionario e tempo/fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario; per quest'ultimo dovrà essere indicato, invece, il BCF_{ss} ridotto). Occorrerà altresì precisare le ragioni per le quali è stato deciso di condurre una sperimentazione ridotta, e indicare il BCF_{km} risultante.

C.13 — III Prova di bioaccumulo nei pesci con esposizione per via alimentare

INTRODUZIONE

Il metodo descritto nella presente sezione si applica alle sostanze che non si prestano a una prova mediante l'esposizione in ambiente acquatico (ad esempio perché non è possibile mantenere concentrazioni stabili e misurabili in acqua o il carico corporeo non può essere raggiunto in 60 giorni di esposizione; cfr. le sezioni precedenti per il metodo di esposizione in ambiente acquatico). Va rilevato tuttavia che il risultato da questa prova sarà un fattore di biomagnificazione per via alimentare (BMF) e non un fattore di bioconcentrazione (BCF) ⁽¹⁾.

Nel maggio 2001 un nuovo metodo per le prove di bioaccumulo di sostanze organiche scarsamente solubili in acqua è stato presentato alla conferenza SETAC Europe tenutasi a Madrid (36). Questo lavoro si basa su una serie di studi di bioaccumulo riportati nella letteratura che utilizzano un metodo di misurazione con una dieta addizionata [cfr. ad esempio (37)]. Nei primi mesi del 2004 un progetto di protocollo (38) volto a misurare il potenziale di bioaccumulo delle sostanze organiche scarsamente solubili in acqua alle quali non era applicabile il metodo di bioconcentrazione mediante l'esposizione attraverso l'ambiente acquatico, insieme a un documento di riferimento (39), è stato sottoposto al gruppo di lavoro PBT dell'UE. Tra le ragioni addotte per applicare tale metodo, è stato indicato che l'esposizione potenziale nell'ambiente a tali sostanze scarsamente solubili ($\log K_{ow} > 5$) avviene probabilmente in larga misura per via alimentare [cfr. (40) (41) (42) (43) (44)]. Per questa ragione, le prove con esposizione per via alimentare sono indicate in taluni regolamenti relativi alle sostanze chimiche ⁽²⁾. Va rilevato, tuttavia, che il metodo qui descritto evita accuratamente l'esposizione attraverso l'ambiente acquatico e, di conseguenza, un BMF ottenuto da tale metodo di prova non è direttamente comparabile con un BMF ottenuto con uno studio sul campo (che consente una combinazione di esposizione in ambiente acquatico e per via alimentare).

Questa sezione si basa sul presente protocollo (38) e presenta una nuova metodologia che non figurava nella versione precedente del metodo C.13. Questa prova alternativa consente di esaminare direttamente l'esposizione per via alimentare, in condizioni controllate di laboratorio.

Prima di procedere a tale esame, occorre fare riferimento ai paragrafi da 1 a 14 del presente metodo di prova per comprendere le circostanze nelle quali l'esperimento con esposizione per via alimentare è preferibile all'esame con esposizione in ambiente acquatico. Tali paragrafi contengono anche informazioni sulle sostanze, e occorre prenderne conoscenza prima di eseguire la prova.

L'utilizzo di sostanze radiomarcate può essere considerato per gli stessi motivi adottati per il metodo di esposizione in ambiente acquatico (cfr. paragrafi 6 e 65).

Il metodo di esposizione per via alimentare può servire ad analizzare più sostanze in un'unica prova, se sono soddisfatti determinati criteri, esaminati in dettaglio nel paragrafo 112. Per maggiore semplicità, il metodo qui presentato descrive la prova eseguita con una sola sostanza in esame.

La prova con esposizione per via alimentare è simile alla prova con esposizione attraverso l'ambiente acquatico sotto molti aspetti ad eccezione, ovviamente, della modalità di esposizione. Pertanto il metodo qui proposto si sovrappone in molti punti al metodo di esposizione in ambiente acquatico di cui alla sezione precedente. Per quanto possibile sono stati introdotti rinvii ai paragrafi pertinenti della sezione precedente, ma per motivi di leggibilità e di comprensione alcune ripetizioni risultano inevitabili.

⁽¹⁾ Cfr. appendice 1, Definizioni e unità di misura.

⁽²⁾ Ai fini dell'applicazione del regolamento (CE) n. 1907/2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) (GU L 396 del 30.12.2006, pag. 1), la questione è affrontata nella "Guida alle prescrizioni in materia di informazione e alla valutazione della sicurezza chimica", capitolo R.7c, R.7.10.3.1, pp 13; R.7.10.4.1, pp 31-32; e figura R7.10-2, pp 50.

PRINCIPIO DELLA PROVA

Si possono utilizzare condizioni a flusso continuo o semistatiche (cfr. paragrafo 4). Le prove a flusso continuo sono preferibili per limitare l'esposizione potenziale della sostanza in esame attraverso l'ambiente acquatico a seguito di desorbimento degli alimenti addizionati o feci. La prova consta di due fasi: assorbimento (sostanza in esame-mangimi addizionati) e depurazione (mangimi «puliti», non trattati) (cfr. paragrafo 16). Durante la fase di assorbimento, un gruppo di pesci soggetto a esposizione è alimentato quotidianamente con mangimi commerciali specifici per specie ittiche di composizione nota, addizionati con la sostanza in esame. Idealmente, i pesci dovrebbero consumare tutti i prodotti alimentari offerti (cfr. paragrafo 141). Durante la fase di depurazione, i pesci sono quindi alimentati con il medesimo mangime commerciale "puro" (non trattato). Con il metodo di esposizione attraverso l'ambiente acquatico, è possibile, se necessario, utilizzare più di un gruppo variando la concentrazione della sostanza in esame, ma per la maggior parte delle sostanze organiche fortemente idrofobe è sufficiente un solo gruppo di trattamento (cfr. paragrafi 49 e 107). In condizioni semistatiche il pesce è trasferito in un nuovo ambiente e/o una nuova vasca di trattamento alla fine della fase di assorbimento (nel caso in cui il terreno o l'apparecchiatura utilizzata durante la fase di assorbimento siano stati contaminati dalla sostanza in esame mediante lisciviazione). Le concentrazioni della sostanza in esame nel pesce sono misurate in entrambe le fasi della prova. Oltre al gruppo di pesci alimentati con una dieta addizionata (il gruppo di trattamento), un gruppo di pesci di controllo viene mantenuto in condizioni identiche e con il medesimo regime alimentare, tranne il fatto che il mangime non è addizionato della sostanza in esame. Il gruppo di controllo permette di quantificare la concentrazione della sostanza in esame nei pesci non esposti e serve da termine di riferimento qualora si osservassero effetti nocivi imputabili al trattamento nel gruppo o gruppi di trattamento⁽¹⁾. Ciò consente inoltre il confronto dei tassi di crescita costanti tra i gruppi per accertare che siano state consumate medesime quantità di alimentazione (occorre anche tenere conto delle qualità organolettiche potenzialmente diverse dei mangimi per spiegare la differenza tra le costanti cinetiche di crescita; Cfr. paragrafo 138). È importante che durante le fasi di assorbimento e di depurazione, i regimi alimentari dei gruppi di trattamento e di controllo siano equivalenti sotto il profilo nutrizionale.

Una fase di assorbimento che dura tra 7 e 14 giorni è generalmente sufficiente, sulla base dell'esperienza maturata dagli sperimentatori che hanno messo a punto tali metodi di prova (38) (39). Tale durata dovrebbe consentire di minimizzare i costi dell'esperimento, garantendo un'esposizione sufficiente per la maggior parte delle sostanze. Tuttavia, in alcuni casi può essere più opportuno prolungare la fase di assorbimento (cfr. paragrafo 127). Durante la fase di assorbimento, la concentrazione della sostanza nei pesci può non raggiungere lo stato stazionario, pertanto il trattamento dei dati e i risultati ottenuti con tale metodo si basano in generale su una analisi cinetica dei residui tessutali. (Nota: si possono applicare anche in questo caso le equazioni per calcolare il tempo di raggiungimento dello stato stazionario utilizzate nella prova con esposizione in ambiente acquatico (cfr. appendice 5). La fase di depurazione inizia dal momento in cui si somministrano ai pesci mangimi non addizionati; essa dura solitamente fino a 28 giorni, o qualora ciò richieda tempi più brevi, fino a quando la sostanza in esame non sia più quantificabile nel pesce intero. La fase di depurazione può essere abbreviata o prolungata oltre i 28 giorni, secondo le variazioni nel tempo delle concentrazioni chimiche misurate e delle dimensioni dei pesci.

Questo metodo consente di determinare il tempo di dimezzamento specifico della sostanza ($t_{1/2}$, in base alla costante cinetica di depurazione, k_d), l'efficienza di assimilazione (assorbimento intestinale; a), il fattore di biomagnificazione alimentare cinetico (BMF_K), il fattore di biomagnificazione cinetico per via alimentare corretto per la crescita (BMF_{Kc}) e il fattore di biomagnificazione cinetico per via alimentare corretto per il tenore lipidico (BMF_{Kl}) (e/o il fattore di biomagnificazione cinetico per via alimentare corretto per la crescita e per i grassi, BMF_{Kgl}) per la sostanza in esame nel pesce⁽²⁾. Per quanto riguarda il metodo di esposizione in ambiente acquatico, l'aumento di peso del pesce durante l'esperimento provocherà la diluizione della sostanza in esame. Conseguentemente, il BMF (cinetico) risulterà sottostimato se non corretto per la crescita (cfr. paragrafi 162 e 163). Inoltre, se si ritiene che lo stato stazionario sia stato raggiunto nella fase di assorbimento, si può calcolare il BMF indicativo allo stato stazionario. Diversi metodi consentono di calcolare un fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_K) a partire dai dati ottenuti nello studio per via alimentare [ad esempio (44) (45) (46) (47) (48)]. I pro e i contro di questi approcci sono analizzati nell'appendice 8.

La prova è stata concepita in primo luogo per le sostanze organiche non polari scarsamente solubili in acqua che seguono essenzialmente cinetiche di assorbimento e di depurazione di primo ordine nei pesci. Quando la sostanza in esame non segue cinetiche di assorbimento e di depurazione di primo ordine, occorre impiegare modelli più complessi (cfr. bibliografia dell'appendice 5) con l'assistenza di un esperto in biostatistica e/o farmacocinetica.

⁽¹⁾ Per la maggior parte delle sostanze in esame idealmente non si dovrebbe individuare alcunché nell'acqua di controllo. Le concentrazioni naturali sono pertinenti solo per i materiali presenti in natura (alcuni metalli) e per le sostanze presenti ovunque nell'ambiente.

⁽²⁾ Il BMF è definito come il rapporto tra la concentrazione di una sostanza in un organismo e la concentrazione della sostanza nell'alimentazione di tale organismo allo stato stazionario, i grassi sono presi in considerazione correggendo i valori ottenuti in funzione dei lipidi presenti nell'organismo e nei mangimi, da cui il termine più preciso di "correzione". Tale approccio differisce dalla "normalizzazione" rispetto a un determinato tenore in lipidi dell'organismo, come avviene nella prova di bioconcentrazione mediante l'esposizione in ambiente acquatico.

Di norma, si determina il BMF utilizzando l'analisi della sostanza in esame per il pesce intero (peso umido). Se pertinenti in relazione agli obiettivi dello studio, è possibile prelevare determinati tessuti (ad esempio muscolo, fegato) se il pesce è diviso in parti commestibili e non commestibili (cfr. paragrafo 21). Inoltre, la rimozione e l'analisi separata del tubo gastroenterico possono servire a determinare il contributo alle concentrazioni in pesci interi a diversi tempi di campionamento, alla fine della fase di assorbimento e all'inizio della fase di depurazione, o nel quadro di un approccio basato sul bilancio di massa.

Il tenore lipidico dei pesci (interi) campionati è misurato per garantire che le concentrazioni siano corrette per i grassi, tenendo conto del tenore lipidico sia contenuto nei mangimi sia presente nei pesci (cfr. paragrafi 56 e 57 e appendice 7).

Ogni pesce campionato viene pesato e il peso viene registrato e collegato alla concentrazione chimica analizzata per tale esemplare (ad esempio attribuendo un identificatore unico a ciascun pesce campionato), per calcolare la crescita del pesce in fase di prova. Nella misura del possibile, occorre misurare la lunghezza totale del pesce (¹). I dati relativi al peso sono necessari anche per stimare il fattore di bioconcentrazione (BCF) utilizzando i dati della fase di depurazione dalla prova con esposizione per via alimentare.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA IN ESAME

Occorre disporre delle informazioni sulla sostanza in esame descritte ai paragrafi 3 e 22. Un metodo per analizzare le concentrazioni della sostanza in esame nell'acqua non è in genere necessario; i metodi da applicare devono presentare una sensibilità appropriata per misurare le concentrazioni nei mangimi per pesce e nei tessuti del pesce.

Il metodo può essere impiegato per valutare più di una sostanza durante un'unica prova. Tuttavia, le sostanze in esame dovranno essere compatibili tra loro, di modo che non interagiscano o cambino la loro identità chimica dopo l'addizione in un mangime per pesci. L'obiettivo è che i risultati misurati per ogni sostanza testata congiuntamente non differiscano notevolmente dai risultati che sarebbero stati ottenuti con prove individuali per ciascuna sostanza in esame. Una valutazione analitica preliminare dovrebbe stabilire che ciascuna sostanza può essere isolata da un campione di pesce o di mangime addizionato di diverse sostanze, con i) livelli elevati di recupero (> 85 % del valore nominale) e ii) la sensibilità necessaria al corretto svolgimento della prova. La quantità totale delle sostanze testate congiuntamente dovrebbe essere inferiore alla concentrazione combinata che potrebbe causare effetti tossici (cfr. paragrafo 51). Il disegno sperimentale dovrebbe inoltre tener conto dei potenziali effetti nocivi nei pesci e delle possibili interazioni (effetti metabolici) associati all'esame congiunto di più sostanze. Occorre evitare di esaminare contemporaneamente le sostanze ionizzabili. In termini di esposizione, il metodo si presta anche a miscele complesse (cfr. paragrafo 13, anche se i limiti dell'analisi saranno gli stessi con qualsiasi metodo).

VALIDITÀ DELLA PROVA

La validità della prova è subordinata all'osservanza delle seguenti condizioni (cfr. paragrafo 24):

- la variazione della temperatura dell'acqua è inferiore a ± 2 °C nei gruppi di controllo e nei gruppi trattati;
- la concentrazione dell'ossigeno disciolto è superiore o uguale al 60 % del valore di saturazione dell'aria;
- la concentrazione della sostanza in esame nel mangime per pesci prima e alla fine della fase di assorbimento è compresa in un intervallo di ± 20 % (sulla base di almeno tre prelievi effettuati in questi due momenti);
- un elevato grado di omogeneità della sostanza nei mangimi è dimostrato mediante analisi preliminare sui mangimi addizionati; almeno tre concentrazioni della sostanza misurata su campioni prelevati all'inizio della prova non devono variare di oltre ± 15 % dalla media;

(¹) La lunghezza totale deve essere registrata durante la prova, poiché costituisce un buon indicatore degli eventuali effetti nocivi osservati.

- la concentrazione della sostanza in esame non è individuata, o solo sotto forma di tracce abituali, nell'alimentazione non addizionata o nei tessuti del pesce di controllo rispetto ai campioni trattati;
- la mortalità, le malattie o altri effetti nocivi sia nei gruppi di pesci di controllo sia in quelli trattati è inferiore o uguale al 10 % al termine della prova. Se la prova viene prolungata per qualsiasi motivo, gli effetti nocivi in entrambi i gruppi sono inferiori o pari al 5 % al mese, e al 30 % cumulativamente. Differenze significative di crescita media tra i campioni del gruppo di prova e del gruppo di controllo potrebbero indicare un effetto tossico della sostanza in esame.

SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Se un laboratorio non ha effettuato la prova in precedenza o se ha apportato modifiche significative (cambio di ceppo o di fornitore di pesci, specie ittica diversa, cambiamento significativo delle dimensioni o dell'alimentazione dei pesci, o del metodo di arricchimento, ecc.), si consiglia di verificare le competenze tecniche disponibili, utilizzando una sostanza di riferimento. La sostanza di riferimento viene usata principalmente per stabilire se la tecnica di arricchimento dell'alimentazione consente di garantire l'omogeneità e la biodisponibilità massime delle sostanze di prova. Ad esempio, la sostanza di riferimento per le sostanze idrofobe non polari è l'esaclorobenzene (HCB), ma a causa delle proprietà pericolose dell'HCB dovrebbero essere considerate altre sostanze per le quali sono disponibili dati affidabili sull'assorbimento e sulla biomagnificazione⁽¹⁾. Se utilizzata, informazioni generali sulla sostanza di riferimento devono figurare nella relazione sulla prova, in particolare il nome, la purezza, il numero CAS, la struttura, la tossicità (se disponibile), come per le sostanze in esame (cfr. paragrafi 3 e 22).

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiatura

Il materiale e le apparecchiature vanno utilizzati come descritto per la prova di esposizione in ambiente acquatico (cfr. paragrafo 26). Occorre utilizzare un sistema di rinnovo a flusso continuo o statico che fornisca un volume di acqua di diluizione sufficiente alle vasche sperimentali. Le portate devono essere registrate.

Acqua

L'acqua di prova è utilizzata come descritto per la prova di esposizione in ambiente acquatico (cfr. paragrafi da 27 a 29). Il mezzo di prova deve presentare le caratteristiche richieste e la sua qualità va mantenuta costante per tutta la durata della prova. Il contenuto naturale di particolato e il carbonio organico totale deve essere il più basso possibile (≤ 5 mg/l di particolato; ≤ 2 mg/l di carbonio organico totale) prima dell'inizio della prova. Il carbonio organico totale è misurato solo prima della prova al momento della caratterizzazione dell'acqua utilizzata per la prova (cfr. paragrafo 53).

Regime alimentare

Si raccomanda l'uso di mangime per pesci disponibile in commercio (con granuli galleggianti e/o a discesa lenta), caratterizzato almeno in termini di proteine e di materie grasse. I granuli presentano una dimensione uniforme per accrescere l'efficienza dell'esposizione per via alimentare; in questo modo, i pesci mangeranno di più, poiché non si limiteranno a mangiare solo i pezzi più grossi, tralasciando quelli piccoli. È inoltre necessario che la dimensione dei granuli sia adeguata alla dimensione dei pesci all'inizio della prova (diametro di circa 0,6-0,85 mm per i pesci di lunghezza compresa tra 3 e 7 cm, e di 0,85-1,2 mm per i pesci di lunghezza compresa tra 6 e 12 cm). È possibile uniformare la dimensione dei granuli in funzione dello sviluppo dei pesci all'inizio della fase di depurazione. L'appendice 7 contiene un esempio di un'adeguata composizione degli alimenti per uso commerciale. Nello sviluppo del presente metodo sono stati utilizzati in genere regimi alimentari con un tenore lipidico compreso fra 15 e 20 % (peso umido). È possibile che mangimi per pesci con un tenore di grassi così elevato non siano disponibili in determinate regioni. In tal caso, la prova può essere effettuata con un tenore di grassi inferiore e, se necessario, il tasso di somministrazione va adeguato in modo da mantenere lo stato di salute dei pesci (sulla base di una prova preliminare). Il tenore totale di lipidi dell'alimentazione del gruppo trattato e del gruppo di controllo è misurato e registrato prima dell'inizio della prova e al termine della fase di assorbimento. La relazione sulla prova deve presentare le informazioni dettagliate indicate dal fornitore di mangimi commerciali relativamente all'analisi dei nutrienti, del tenore di umidità, fibre e ceneri e, se possibile, dei minerali e dei residui di pesticidi (ad es. inquinanti prioritari "standard").

⁽¹⁾ L'HCB figura negli elenchi degli allegati A e C della convenzione di Stoccolma, nonché negli allegati I e III del regolamento (CE) n. 850/2004 relativo agli inquinanti organici persistenti (GU L 158 del 30.4.2004, pag. 7).

Al momento di aggiungere il mangime con la sostanza in esame, occorre garantire, per quanto possibile, l'omogeneità dei mangimi utilizzati durante la prova. La concentrazione della sostanza in esame nella dieta del gruppo trattato è selezionata in funzione della sensibilità della tecnica di analisi, della tossicità della sostanza in esame (NOEC se nota) e dei dati fisico-chimici pertinenti. Se utilizzata, è opportuno incorporare la sostanza di riferimento ad una concentrazione di circa il 10 % di quella della sostanza in esame (o comunque quanto più bassa possibile), in funzione della sensibilità dell'analisi (ad esempio per l'esaclorobenzene, una concentrazione nei mangimi di 1-100 µg/g è stata giudicata accettabile; cfr. (47) per maggiori informazioni sull'efficienza di assimilazione dell'HCB).

La sostanza in esame può essere aggiunta ai mangimi per pesci in modi diversi, secondo le caratteristiche fisiche e la solubilità (cfr. appendice 7 per maggiori informazioni sui metodi di arricchimento):

- se la sostanza è solubile e stabile in trigliceridi, scioglierla in una piccola quantità di olio di pesce o di olio vegetale commestibile prima di mescolarla al mangime per pesci. In tal caso, occorre evitare accuratamente di produrre una razione troppo ricca di lipidi, tenendo conto del tenore naturale di lipidi degli alimenti arricchiti e quindi aumentando la quantità minima nota di olio necessaria per una distribuzione omogenea della sostanza in esame nei mangimi, oppure;
- aggiungere i mangimi utilizzando un solvente organico adatto, fintantoché l'omogeneità e la biodisponibilità non siano compromesse [(micro) cristalli della sostanza in esame potrebbero formarsi negli alimenti in seguito all'evaporazione del solvente, e non esistono metodi facili per dimostrare che tale evaporazione non è avvenuta; cfr. (49)]; oppure
- aggiungere liquidi non viscosi direttamente al mangime per pesci, ma occorre mescolare bene per garantire una ripartizione omogenea e facilitarne l'assimilazione. È opportuno che la tecnologia di miscelazione garantisca l'omogeneità del mangime addizionato.

In alcuni casi, ad esempio nelle prove con sostanze meno idrofobe con maggiore probabilità di deassorbimento dagli alimenti, potrebbe essere necessario rivestire i granuli con una piccola quantità di olio di pesce/mais (cfr. paragrafo 142). In tal caso, anche il mangime di controllo va trattato in modo analogo e il mangime così preparato va utilizzato ai fini della misurazione del tenore di grassi.

Se del caso, i risultati sulla sostanza di riferimento devono essere comparabili con i dati delle prove descritte in letteratura e condotte in condizioni analoghe con una razione alimentare comparabile (cfr. paragrafo 45), e parametri specifici alla sostanza di riferimento devono corrispondere ai pertinenti criteri di cui al paragrafo 113 (3°, 4° e 5° punto).

Se un olio o un solvente è utilizzato come disperdente per la sostanza in esame, si mescoli un quantitativo equivalente di tale disperdente (escludendo la sostanza in esame) al mangime di controllo al fine di mantenere l'equivalenza con il mangime addizionato. È importante che durante le fasi di assorbimento e di depurazione i gruppi trattati e di controllo ricevano un'alimentazione equivalente.

La dieta arricchita è conservata in condizioni che mantengono la stabilità della sostanza in esame nel mix di mangimi (ad es. mediante refrigerazione) e tali condizioni vanno registrate.

Selezione della specie ittica

Tale prova può essere effettuata con le specie ittiche indicate per l'esposizione in ambiente acquatico (cfr. paragrafo 32 e appendice 3). Prima della pubblicazione del presente metodo di prova, gli studi sul bioaccumulo mediante regime alimentare con sostanze organiche utilizzavano sistematicamente la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), la carpa (*Cyprinus carpio*) e il ciprinide *Fathead minnow* (*Pimephales promelas*). È opportuno che le specie esaminate abbiano un comportamento alimentare consistente in un rapido consumo della razione somministrata in modo da ridurre al minimo l'influenza potenziale di qualsiasi fattore che incide sulla concentrazione della sostanza in esame nell'alimento (ad esempio, lisciviazione in acqua e possibile esposizione all'ambiente acquatico). La lunghezza e il peso dei pesci utilizzati sono compresi nei limiti raccomandati (cfr. appendice 3). I pesci non devono essere troppo piccoli da ostacolare le analisi sui singoli esemplari. L'esame delle specie in un periodo di rapido accrescimento può rendere difficile l'interpretazione dei dati, e gli elevati tassi di crescita possono influenzare il calcolo dell'efficienza di assimilazione (¹).

(¹) In caso di rapida crescita durante la fase di assorbimento, la razione alimentare reale scenderà al di sotto di quella definita all'inizio dell'esposizione.

Mantenimento dei pesci

I criteri relativi all'acclimatazione, alla mortalità e ad eventuali malattie sono gli stessi del metodo di esposizione in ambiente acquatico (cfr. paragrafi da 33 a 35).

ESECUZIONE DELLA PROVA

Documento di lavoro e test di definizione dell'intervallo di concentrazioni

Un'analisi preliminare è necessaria per dimostrare la possibilità di isolare la sostanza nei mangimi addizionati o nei tessuti dei pesci. Non è sempre necessario eseguire una prova di determinazione dell'intervallo di concentrazione (*range-finding test*) per decidere la concentrazione adeguata della sostanza chimica nel mangime. Al fine di dimostrare che non si osserva alcun effetto nocivo, di valutare le qualità organolettiche dei mangimi addizionati, di determinare la sensibilità del metodo di analisi nei tessuti dei pesci e dei mangimi e di definire la razione alimentare e i tempi di campionamento adeguati durante la fase di depurazione, ecc., è possibile — ma non obbligatorio — procedere a prove di alimentazione preliminari. Uno studio di osservazione preliminare può essere utile per stimare il numero di pesci necessari per il campionamento durante la fase di depurazione. Ciò può ridurre notevolmente il numero di pesci utilizzati, soprattutto per le sostanze in esame che sono particolarmente sensibili al metabolismo.

Condizioni di esposizione

Durata della fase di assorbimento

Una fase di assorbimento di 7-14 giorni è normalmente sufficiente. In questa fase a un gruppo di pesci viene somministrato il mangime di controllo e a un altro gruppo il mangime trattato. La razione alimentare che viene loro somministrata ogni giorno dipende dalla specie utilizzata e dalle condizioni sperimentali; sarà, ad esempio, tra l'1 e il 2 % del peso del pesce (peso umido) nel caso della trota iridea. La frequenza di alimentazione va definita in modo da evitare una rapida crescita e un aumento significativo del tenore di grassi. Se necessario, è possibile prolungare la fase di assorbimento in funzione degli insegnamenti tratti da studi precedenti o di informazioni note sull'assorbimento o sulla depurazione della sostanza in esame (o analoga) nei pesci. L'inizio della prova è stabilito al momento della prima somministrazione della dieta addizionata. Un giorno di prova è calcolato dal momento della somministrazione di una razione alimentare fino a poco prima della razione successiva (ad esempio, un'ora prima). Pertanto, nella fase di assorbimento, il primo giorno di prova inizia con la prima somministrazione della dieta addizionata e termina subito prima della seconda razione addizionata. In pratica, la fase di assorbimento termina subito prima (ad esempio un'ora prima) della prima somministrazione di cibo non addizionato della sostanza in esame, dato che il pesce continua a digerire gli alimenti addizionati e ad assorbire la sostanza in esame nel corso delle successive 24 ore. È importante assicurare che il carico corporeo della sostanza in esame sia sufficientemente elevato (non tossico) per quanto riguarda il metodo di analisi, affinché si possa misurare un calo di almeno un ordine di grandezza durante la fase di depurazione. In taluni casi si può prolungare la fase di assorbimento (fino a 28 giorni) effettuando campionamenti supplementari per approfondire le conoscenze sulla cinetica di assorbimento. Durante l'assorbimento, la concentrazione nel pesce può non raggiungere lo stato stazionario. Per stimare il tempo occorrente per raggiungere lo stato stazionario, e avere così un'indicazione della probabile durata necessaria per ottenere concentrazioni significative nel pesce, è possibile applicare le equazioni indicate per la prova di esposizione in ambiente acquatico (cfr. appendice 5).

In alcuni casi potrebbe essere noto in anticipo che una durata di assorbimento di 7-14 giorni della sostanza chimica nel pesce non è sufficiente perché la concentrazione nei mangimi consenta di raggiungere una concentrazione nel pesce sufficientemente elevata per analizzare una diminuzione di almeno un ordine di grandezza durante la depurazione, a causa della scarsa sensibilità del metodo di analisi o di un'efficienza di assimilazione troppo bassa. In tal caso, può essere utile protrarre la fase iniziale di alimentazione oltre i 14 giorni o, soprattutto nel caso di sostanze ad elevata metabolizzazione, prevedere una concentrazione maggiore nella dieta. Occorre tuttavia mantenere il carico corporeo durante l'assorbimento al di sotto della concentrazione senza effetti osservati (NOEC) cronica (stimata) nei tessuti del pesce (cfr. paragrafo 138).

Durata della fase di depurazione

Di norma, la depurazione dura fino a 28 giorni ed inizia con la prima somministrazione ai pesci del gruppo di prova di mangimi puri, non addizionati, dopo la fase di assorbimento. La depurazione inizia con la prima razione non addizionata anziché dall'ultima razione addizionata, poiché il pesce continua a digerire gli alimenti e ad assorbire la sostanza in esame nel corso delle successive 24 ore, come indicato al paragrafo 126. Pertanto, il primo campione della fase di depurazione è prelevato immediatamente prima della seconda razione non addizionata. Tale periodo di depurazione è inteso a individuare le sostanze con un tempo di dimezzamento di 14 giorni, corrispondente alle caratteristiche delle sostanze bioaccumulabili, una prova della durata di 28 giorni comprende quindi due tempi di dimezzamento di tali sostanze ⁽¹⁾. Con le sostanze fortemente bioaccumulabili, può essere utile estendere la fase di depurazione (se indicato dall'esame preliminare).

Se una sostanza è eliminata molto lentamente al punto che non si possa determinare un tempo di dimezzamento esatto durante la fase di depurazione, le informazioni ottenute possono comunque essere sufficienti ai fini della valutazione e indicare un livello elevato di bioaccumulo. Al contrario, se la sostanza è eliminata molto rapidamente al punto che non si può ottenere né alcuna concentrazione affidabile al tempo 0 (concentrazione alla fine della fase di assorbimento o all'inizio della fase di depurazione, $C_{0,d}$) né k_2 , si può procedere a una stima prudente di k_2 (cfr. appendice 7).

Se le prime analisi dei pesci campionati (7 o 14 giorni) indicano che la sostanza in esame è stata eliminata al di sotto dei livelli di rilevabilità prima della fine del periodo completo di 28 giorni, si può annullare il campionamento successivo e interrompere la prova.

In alcuni casi non si constata alcun assorbimento misurabile della sostanza in esame alla fine del periodo di assorbimento (o con il secondo campione nella fase di depurazione). Se si può dimostrare che i) i criteri di validità di cui al paragrafo 113 sono soddisfatti, e che ii) tale scarso assorbimento non è dovuto ad un difetto della prova (ad esempio, durata di assorbimento insufficiente, tecnica di arricchimento inadeguata con scarsa biodisponibilità, sensibilità insufficiente del metodo d'analisi, mancato consumo dell'alimento da parte dei pesci, ecc.), è possibile porre fine allo studio senza dover ripetere la prova con una durata di assorbimento più lunga. Se lo studio preliminare indica che ciò possa essere il caso, può essere consigliabile, se possibile, analizzare le feci per esaminare la sostanza in esame non digerita secondo un approccio basato sul bilancio di massa.

Numero di pesci sperimentali

Come per la prova di esposizione attraverso l'ambiente acquatico, occorre scegliere pesci di peso e lunghezza simili e il più piccolo di essi non deve avere un peso inferiore a due terzi del pesce più grande (cfr. paragrafi da 40 a 42).

Il numero totale di pesci utilizzati per lo studio va stabilito in funzione del programma di campionamento (almeno un prelievo alla fine della fase di assorbimento e quattro o sei prelievi durante la fase di depurazione, secondo la durata di ciascuna fase). Occorre inoltre tenere conto della sensibilità della tecnica di analisi, la concentrazione che può essere raggiunta alla fine della fase di assorbimento (secondo le informazioni disponibili ex ante) e la durata della fase di depurazione (se le informazioni disponibili in precedenza ne consentono una stima). Occorre prelevare ogni volta tra cinque e dieci pesci e quantificarne la crescita (peso e lunghezza totale) prima dell'analisi chimica o del contenuto lipidico.

A causa della variabilità inevitabile delle dimensioni, della crescita e della fisiologia dei pesci e della quantità probabilmente variabile di cibo ingerita da ciascuno, è necessario prelevare per ciascun tempo di campionamento almeno cinque pesci di prova e cinque esemplari del gruppo di controllo per accertare in modo adeguato la concentrazione media e la relativa variabilità. La variabilità dei parametri nei pesci può incrementare la variabilità incontrollata complessiva della prova più di quanto dipenda dalla variabilità intrinseca dei metodi di analisi applicati, il che giustifica l'utilizzo, in alcuni casi, di un massimo di dieci esemplari per campionamento. Tuttavia, se i livelli di fondo delle concentrazioni della sostanza in esame nei pesci di controllo non sono misurabili all'inizio della fase di depurazione, l'analisi chimica di due o tre pesci di controllo nell'ultimo periodo di campionamento può essere sufficiente solo se si continua a campionare gli esemplari rimanenti del gruppo di controllo in funzione del loro peso e lunghezza totale (in modo da prelevare ogni volta lo stesso numero nei gruppi di prova e di controllo per tener conto della loro crescita). I pesci sono conservati, pesati individualmente (anche se successivamente si rende necessario combinare i risultati dei prelievi) e misurati (lunghezza totale).

⁽¹⁾ Nel quadro di uno studio con esposizione attraverso l'ambiente acquatico, un tempo di dimezzamento di 14 giorni corrisponde a un fattore di bioconcentrazione di circa 10 000 l/kg utilizzando pesci di 1 g con un tasso di assorbimento di circa 500 l/kg/d [secondo l'equazione di Sijm et al. (46)].

Pertanto, una prova tipo che prevede una fase di depurazione di 28 giorni e cinque prelievi richiederà un totale di 59-120 pesci nel gruppo di prova e tra 50 e 110 pesci nel gruppo di controllo, supponendo che la tecnica di analisi della sostanza consenta di analizzare il contenuto di grassi su uno stesso pesce. Se non è possibile analizzare la sostanza chimica e il tenore di lipidi sullo stesso pesce e non è nemmeno possibile utilizzare un pesce di controllo per analizzarne il contenuto di grassi (cfr. paragrafo 56), si devono aggiungere 15 esemplari (tre dallo stock di pesci all'inizio della prova, tre rispettivamente dal gruppo di controllo e dal gruppo di prova all'inizio della fase di depurazione e tre rispettivamente dal gruppo di controllo e dal gruppo di prova alla fine dell'esperimento). Un programma di campionamento con il numero dei pesci utilizzati è riportato nell'appendice 4.

Carico

Usare rapporti acqua/pesce altrettanto elevati di quelli utilizzati nel metodo di esposizione in ambiente acquatico (cfr. paragrafi 43 e 44). Sebbene i tassi di carico pesci/acqua non influiscano in alcun modo sulle concentrazioni di esposizione durante la prova, si raccomanda di applicare un tasso di carico compreso tra 0,1 e 1,0 g di pesce (peso umido) per litro d'acqua per giorno in modo da mantenere le concentrazioni di ossigeno disciolto e ridurre al minimo lo stress per gli organismi testati.

Dieta e somministrazione durante la prova

Durante il periodo di acclimatazione, i pesci ricevono un'alimentazione appropriata (cfr. paragrafo 117). Se la prova è eseguita con un sistema a flusso continuo, è opportuno interrompere il flusso al momento della somministrazione del cibo.

Durante la prova, l'alimentazione del gruppo di prova deve essere conforme ai criteri descritti in precedenza (cfr. paragrafi da 116 a 121). Oltre alle caratteristiche specifiche della sostanza in esame, della sensibilità del metodo di analisi, della concentrazione prevista nell'alimentazione in funzione delle condizioni ambientali e dei livelli di tossicità cronica/carico corporeo, occorre tener conto, nel definire la concentrazione di prova della sostanza, delle qualità organolettiche dei mangimi (di modo che i pesci non evitino di assumerli). La concentrazione nominale della sostanza in esame va indicata nella relazione sulla prova. In base all'esperienza, le concentrazioni comprese tra 1 e 1 000 µg/g offrono un intervallo operativo adeguato per valutare le sostanze che non presentano alcun meccanismo tossico specifico. Per quanto riguarda le sostanze che agiscono con un meccanismo non specifico, i livelli nei residui tissutali non dovrebbero essere superiori a 5 mol/g di grassi, altrimenti rischiano di provocare effetti cronici (19) (48) (50) (1). Per le altre sostanze, è opportuno assicurarsi che nessun effetto nocivo derivi dall'esposizione cumulata (cfr. paragrafo 127). Ciò vale in particolar modo se più sostanze sono testate congiuntamente (cfr. paragrafo 112).

La quantità adeguata della sostanza in esame può essere addizionata ai mangimi per pesci in tre modi (cfr. paragrafo 119 e appendice 7). I metodi e le procedure di arricchimento utilizzati vanno specificati nella relazione sulla prova. I pesci di controllo sono alimentati con mangimi non addizionati; nella fase di assorbimento, tali mangimi devono contenere la medesima quantità di olio eventualmente utilizzato come disperdente nel mangime addizionato oppure la stessa quantità di solvente "puro", se il solvente è stato utilizzato come disperdente nella preparazione del mangime addizionato da somministrare al gruppo di prova. È necessario analizzare almeno tre campioni della concentrazione della sostanza in esame nei mangimi, trattati e non trattati, prima dell'inizio e alla fine della fase di assorbimento. Dopo l'esposizione al regime addizionato (fase di assorbimento) i pesci (entrambi i gruppi) ricevono mangimi non trattati (fase di depurazione).

I pesci ricevano una razione alimentare determinata (a seconda della specie; circa 1-2 % del peso umido al giorno nel caso della trota iridata). L'esatta razione alimentare va determinata in modo da evitare una rapida crescita dei pesci e un forte aumento del tenore di grassi. È opportuno specificare nella relazione le dosi esatte somministrate per tutta la durata della prova. La prima razione si basa sul peso dello stock di pesce misurato appena prima dell'inizio della prova. La quantità di mangime deve essere adattata in funzione del peso umido dei pesci prelevati ai differenti tempi di campionamento previsti, per tener conto della loro crescita nel corso dell'esperimento. Il peso e la lunghezza dei pesci nelle vasche sperimentali e di controllo possono essere stimati in base al peso e alla lunghezza totale dei pesci di prova utilizzati in occasione di ogni campionamento; non pesare né misurare i pesci rimasti nelle vasche sperimentali e di controllo. È importante mantenere la medesima razione alimentare durante l'intero esperimento.

(1) Atteso che le concentrazioni interne reali possono essere determinate solo al termine della prova, è necessario stimare la concentrazione interna prevista (ad esempio tramite il BMF previsto e la concentrazione nel mangime; cfr. l'appendice 5 (A5.8)).

Occorre osservare l'alimentazione dei pesci per assicurarsi che i pesci consumino chiaramente tutto il mangime presentato in modo da garantire che i tassi di ingestione utilizzati nei calcoli siano corretti. Si considererà l'opportunità di eseguire esperimenti preliminari di somministrazione o di tener conto di esperienze precedenti nella scelta di un regime alimentare che garantisca che la razione giornaliera somministrata in un'unica soluzione viene totalmente consumata. Se una parte del mangime rimane sistematicamente non consumato, può essere opportuno ripartire la razione su un ulteriore periodo di somministrazione in ciascun giorno di esperimento (ad es. la stessa quantità giornaliera ma somministrata in due volte anziché una). Se ciò è necessario, la seconda somministrazione deve avvenire in un momento preciso, da stabilirsi in modo che intercorra il massimo tempo possibile prima del campionamento del pesce (ad esempio, la seconda razione viene somministrata nella prima metà del giorno di esperimento).

Sebbene in generale i pesci consumino rapidamente il cibo somministrato, è importante garantire che la sostanza in esame rimanga adsorbita negli alimenti. Occorre pertanto fare in modo che la sostanza in esame non si disperda in acqua, il che esporrebbe i pesci a concentrazioni della sostanza in esame nell'ambiente acquatico in aggiunta alla via alimentare. A tal fine, è opportuno eliminare il cibo non consumato (e le feci) dalle vasche sperimentali e di controllo entro un'ora o, di preferenza, entro 30 minuti dalla somministrazione. Inoltre, si può utilizzare un sistema di depurazione continua dell'acqua mediante un filtro a carbone, che adsorbe qualsiasi contaminante disciolto. I sistemi a flusso continuo possono contribuire a evacuare rapidamente le particelle alimentari e le sostanze sciolte ⁽¹⁾. Talvolta, una leggera modifica della tecnica di arricchimento degli alimenti può contribuire ad attenuare il problema (cfr. paragrafo 119).

Illuminazione e temperatura

Per quanto riguarda il metodo di esposizione in ambiente acquatico (cfr. paragrafo 48) si raccomanda un fotoperiodo di 12-16 ore e una temperatura (± 2 °C) adeguata alla specie utilizzata (cfr. appendice 3). Tipo e caratteristiche dell'illuminazione devono essere noti e documentati.

Controlli

Occorre utilizzare un gruppo di controllo, alimentato con lo stesso mangime del gruppo di prova che però non contiene la sostanza in esame. Se per aggiungere gli alimenti del gruppo di prova è stato utilizzato un olio o un solvente come disperdente, occorre trattare il cibo del gruppo di controllo esattamente allo stesso modo, ma senza l'aggiunta della sostanza in esame affinché l'alimentazione dei gruppi di prova e di controllo siano equivalenti (cfr. paragrafi 121 e 139).

Frequenza delle misurazioni della qualità dell'acqua

Le condizioni descritte per la prova di esposizione in ambiente acquatico si applicano anche in questo caso, ad eccezione del fatto che il carbonio organico totale è misurato solo prima della prova, al momento della caratterizzazione dell'acqua utilizzata per la prova (cfr. paragrafo 53).

Campionamento e analisi dei pesci e dell'alimentazione

Analisi dei campioni alimentari

Almeno tre campioni di cibo addizionato e non addizionato sono analizzati, per determinare la concentrazione della sostanza in esame e il contenuto di lipidi, almeno prima dell'inizio e alla fine della fase di assorbimento. I metodi di analisi e le procedure applicate per garantire l'omogeneità del regime alimentare vanno specificati nella relazione sulla prova.

⁽¹⁾ La presenza della sostanza nel mezzo di prova attraverso le feci del pesce o a seguito di lisciviazione del cibo non può essere del tutto evitata. È possibile ad esempio misurare la concentrazione della sostanza presente nell'acqua alla fine della fase di assorbimento, soprattutto quando si utilizza un sistema semistatico, per stabilire se si è verificata un'esposizione in ambiente acquatico.

Occorre analizzare la sostanza in esame nei campioni conformemente alla metodologia definita e convalidata. Si procede a uno studio per stabilire il limite di quantificazione, la percentuale di isolamento, le interferenze e la variabilità dell'analisi nella prevista matrice del campione. Se viene testata una sostanza radiomarcata, si dovranno fare considerazioni analoghe a quelle relative al metodo di esposizione in ambiente acquatico, nelle quali l'analisi degli alimenti sostituisce l'analisi dell'acqua (cfr. paragrafo 65).

Analisi dei pesci

Ad ogni campionamento si prelevano tra 5 e 10 esemplari in ciascuno dei gruppi di controllo e di prova (in alcuni casi il numero dei pesci di controllo può essere ridotto; cfr. paragrafo 134).

I campionamenti devono avvenire nello stesso momento in ciascun giorno di sperimentazione (in funzione del momento di somministrazione alimentare), e dovrebbe essere stabiliti in modo da ridurre la probabilità che il cibo rimanga nell'intestino durante la fase di assorbimento e l'inizio della fase di depurazione al fine di evitare di falsare le concentrazioni totali della sostanza in esame (cioè i pesci campionati vanno rimossi alla fine di un giorno sperimentale, tenendo presente che un giorno di sperimentazione inizia al momento della somministrazione di cibo e termina al momento della successiva alimentazione, circa 24 ore più tardi. La fase di depurazione inizia con la prima razione di cibo «non addizionato» (cfr. paragrafo 128). Il primo campione della fase di depurazione (prelevato immediatamente prima della seconda razione non addizionata) è importante in quanto serve a calcolare la concentrazione al tempo 0, mediante estrapolazione al giorno prima ($C_{0,d}$, la concentrazione nel pesce alla fine dell'assorbimento/all'inizio della depurazione). In alternativa, si possono prelevare e analizzare separatamente il tratto gastrointestinale del pesce alla fine dell'assorbimento e nei giorni 1 e 3 della fase di depurazione.

Per ciascun tempo di campionamento occorre prelevare i pesci dalle vasche sperimentali e di controllo e trattarli allo stesso modo descritto per il metodo di esposizione in ambiente acquatico (cfr. paragrafi da 61 a 63).

Misurare le concentrazioni della sostanza in esame nel pesce (peso umido) almeno alla fine della fase di assorbimento e durante la fase di depurazione nei gruppi di controllo e di prova. Durante la fase di depurazione, si raccomandano 4-6 tempi di campionamento (ad esempio nei giorni 1, 3, 7, 14 e 28). In alternativa, è possibile includere un tempo di campionamento supplementare dopo 1-3 giorni di assorbimento al fine dell'efficienza di assimilazione dalla fase lineare di assorbimento per i pesci mentre è ancora vicina all'inizio del periodo di esposizione. Esistono due principali deviazioni rispetto al programma: i) se si utilizza una proroga della fase di assorbimento ai fini dello studio della cinetica di assorbimento, ci saranno ulteriori tempi di campionamento durante la fase di assorbimento e di conseguenza dovrà essere incluso un numero maggiore di pesci (cfr. paragrafo 126); ii) se allo studio è stato posto termine alla fine della fase di assorbimento, a motivo della mancanza di assorbimento misurabile (cfr. paragrafo 131). Gli esemplari di pesci campionati sono pesati (e la loro lunghezza totale misurata) per determinare le costanti cinetiche di crescita. Possono essere misurate anche le concentrazioni della sostanza in specifici tessuti dei pesci (parti commestibili e non commestibili) alla fine della fase di assorbimento e in selezionati punti della fase di depurazione. Se viene testata una sostanza radiomarcata, si dovranno fare considerazioni analoghe a quelle relative al metodo di esposizione in ambiente acquatico, nelle quali l'analisi degli alimenti sostituisce l'analisi dell'acqua (cfr. paragrafo 65).

In caso di utilizzo periodico di una sostanza di riferimento (cfr. paragrafo 25), le concentrazioni vanno misurate di preferenza nel gruppo di prova alla fine dell'assorbimento e in tutti i tempi della depurazione specificati per la sostanza in esame (pesce intero); le concentrazioni nel gruppo di controllo vanno analizzate solo alla fine dell'assorbimento (pesce intero). In alcune circostanze (ad esempio quando le tecniche di analisi della sostanza in esame e della sostanza di riferimento sono incompatibili al punto che è necessario l'utilizzo di pesci supplementari per rispettare il programma di campionamento), si potrà applicare un metodo alternativo per ridurre al minimo il numero di esemplari supplementari necessari. Le concentrazioni della sostanza di riferimento sono misurate durante la fase di depurazione solo nei giorni 1, 3 e in due altri tempi di campionamento selezionati in modo da ottenere stime affidabili della concentrazione al tempo 0 ($C_{0,d}$) e del valore k_2 per la sostanza di riferimento.

Se possibile il contenuto lipidico di ciascun pesce dovrebbe essere determinato ad ogni campionamento, o almeno all'inizio e alla fine della fase di assorbimento e alla fine della fase di depurazione. (cfr. paragrafi 56 e 67). In funzione del metodo analitico utilizzato (cfr. paragrafo 67 e appendice 4), è possibile utilizzare gli stessi pesci per determinare il tenore di grassi e la concentrazione della sostanza in esame. Ciò è preferibile in quanto consente di ridurre al minimo il numero di esemplari necessari. Tuttavia, quando ciò non è possibile, occorre applicare il metodo descritto per il metodo di esposizione in ambiente acquatico (cfr. paragrafo 56 per le diverse opzioni di misurazione del tenore di grassi). Il metodo applicato per quantificare il tenore lipidico va registrato nella relazione sulla prova.

Qualità del metodo analitico

Sono necessarie prove preliminari per verificare la specificità, precisione e riproducibilità della tecnica di analisi specifica per la sostanza e l'isolamento della sostanza in esame nell'alimentazione e nel pesce.

Misurazione della crescita dei pesci

All'inizio della prova, occorre pesare e misurare un campione di pesce proveniente dallo stock ittico. I pesci sono prelevati poco prima (un'ora prima) della somministrazione del mangime addizionato e assegnati al giorno di prova 0. Il numero di animali sottoposti a campionamento deve essere uguale o superiore a quello dei pesci prelevati successivamente durante la prova. Alcuni di questi possono essere gli stessi pesci utilizzati per l'analisi dei lipidi eseguita prima dell'inizio della fase di assorbimento (cfr. paragrafo 153). In occasione di ciascun campionamento, i pesci sono pesati e misurati. Per ciascun esemplare, il peso e la lunghezza sono collegati alla concentrazione chimica analizzata (e eventualmente al tenore di grassi), ad esempio assegnando un codice di identificazione unico a ciascun pesce campionato. Tali misure possono servire a stimare il peso (e la lunghezza dei pesci rimasti nelle vasche di prova e di controllo).

Valutazione della prova

Le osservazioni relative alla mortalità devono essere registrate ogni giorno. Vanno effettuate ulteriori osservazioni per accertare eventuali effetti nocivi, ad esempio un comportamento anomalo o una pigmentazione, che devono essere registrati. I pesci sono considerati morti in assenza di movimenti respiratori o di reazione ad un leggero stimolo meccanico. Ogni esemplare morto o visibilmente morente dovrà essere rimosso.

RELAZIONE SULLA PROVA E RISULTATI

Trattamento dei risultati

I risultati delle prove sono utilizzati per calcolare la costante cinetica di depurazione (k_2) in funzione del peso umido totale del pesce. La costante cinetica di crescita, k_g , basata sull'incremento medio del peso del pesce è calcolata e utilizzata per produrre la costante cinetica di depurazione corretta per la crescita, k_{2g} , se del caso. Si dovrebbe inoltre registrare l'efficienza di assimilazione (a ; assunzione intestinale), il fattore di biomagnificazione cinetica (BMF_k) (se necessario corretto per la crescita, BMF_{kg}), il suo valore corretto per i lipidi (BMF_{kl} o BMF_{kgl} , se corretto dall'effetto di diluizione dovuto alla crescita) e il regime alimentare. Inoltre, qualora sia possibile stimare il tempo necessario per raggiungere lo stato stazionario durante la fase di assorbimento (ad esempio 95 % dello stato stazionario o $t_{95} = 3,0/k_2$), si deve includere una stima del BMF allo stato stazionario (BMF_{ss}) (cfr. paragrafi 105 e 106 e appendice 5) se il valore t_{95} indica che lo stato stazionario è raggiunto. Occorre applicare al BMF_{ss} la stessa correzione per i lipidi applicata al BMF cinetico (BMF_k) per ottenere un valore corretto per il tenore di grassi, BMF_{ss} (non esiste alcuna procedura concordata per correggere un BMF allo stato stazionario dall'effetto di diluizione dovuto alla crescita). Le formule e gli esempi di calcolo sono illustrati nell'appendice 7. Diversi metodi consentono di calcolare un fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_k) a partire dai dati ottenuti nello studio per via alimentare. Essi sono riportati nell'appendice 8.

Peso e lunghezza dei pesci

Il peso umido e la lunghezza di ciascun pesce, a ciascun tempo di campionamento, sono presentati separatamente per i gruppi di prova e i gruppi di controllo durante la fase di assorbimento [(stock ittico all'inizio del periodo di assorbimento; gruppo di controllo e gruppo di prova alla fine del periodo di assorbimento e, se eseguite, la fase iniziale (ad esempio giorni 1-3 della fase di assorbimento) e la fase di depurazione (ad esempio giorni 1, 2, 4, 7, 14, 28, per il gruppo di prova e il gruppo di controllo)]. Il peso è la misura preferita per la crescita ai fini della correzione dall'effetto di diluizione dovuto alla crescita. I paragrafi 162 e 163 e l'appendice 5 presentano il metodo o i metodi utilizzati per la correzione.

Concentrazione della sostanza in esame nel pesce

Le misurazioni dei residui della sostanza in esame effettuate su ogni singolo pesce (o su campioni raggruppati se le singole misurazioni non sono possibili), espresse in termini di concentrazioni del peso umido (w/w), vengono presentate in tabelle, separatamente per ciascun punto di campionamento, per i gruppi di controllo e di prova. Se è stata effettuata un'analisi lipidica su ciascuno dei pesci prelevati, le concentrazioni individuali corrette per il tenore di grassi, espresse in tenore lipidico del pesce umido (w/w lipid), possono essere calcolate e registrate.

- Le misurazioni dei residui della sostanza in esame effettuate su ogni singolo pesce (o su campioni raggruppati se le singole misurazioni non sono possibili, cfr. paragrafo 66) per la fase di depurazione sono trasformate nei loro logaritmi naturali e presentate graficamente in funzione del tempo (giorno). Se sul tracciato si osservano evidenti valori anomali, si può applicare un test statisticamente valido ai valori anomali al fine di eliminare i punti corrispondenti ai dati anomali, la cui omissione dovrà essere debitamente giustificata.
- Una correlazione lineare dei minimi quadrati è calcolata per i dati relativi al logaritmo naturale della concentrazione in funzione del tempo (giorno) di depurazione. La pendenza e intercetta della linea sono registrate come la costante cinetica di depurazione complessiva (k_2) e il logaritmo naturale della concentrazione ottenuto al tempo 0 ($C_{0,d}$) (cfr. appendice 5 e appendice 7 per ulteriori dettagli). Se ciò non è possibile perché le concentrazioni sono inferiori al limite di quantificazione per il secondo campione della fase di depurazione, si può procedere ad una stima prudente di k_2 (cfr. appendice 7).
- Le differenze della pendenza e intercetta della linea sono calcolate utilizzando le tecniche statistiche standard, e gli intervalli di confidenza del 90 % (o del 95 %) di tali risultati sono valutati e presentati.
- La concentrazione media misurata nel pesce l'ultimo giorno della fase di assorbimento (concentrazione misurata al giorno 0, $C_{0,m}$) è calcolata e confrontata con il valore derivato $C_{0,d}$. Se il valore derivato è inferiore al valore misurato, la differenza può indicare la presenza, nell'intestino dei pesci, di cibo addizionato non digerito. Se il valore derivato è notevolmente superiore al valore misurato, ciò può significare che il valore derivato della regressione lineare dei dati di depurazione è errato e dovrebbe essere rivalutato (cfr. appendice 7).

Velocità di depurazione e fattore di biomagnificazione

Per calcolare il fattore di biomagnificazione, occorre innanzitutto ottenere l'efficienza di assimilazione (assorbimento della sostanza in esame per via intestinale, α). A tal fine, è opportuno applicare l'equazione A7.1 dell'appendice 7 che richiede la conoscenza della concentrazione nel pesce ottenuta al giorno 0 della fase di depurazione ($C_{0,d}$), la costante cinetica di depurazione (globale) (k_2), la concentrazione negli alimenti (C_{food}), la costante cinetica di ingestione (I) e la durata della fase di assorbimento (t). La pendenza e l'intercetta della relazione lineare tra il logaritmo naturale della concentrazione e il tempo di depurazione sono registrate come la costante cinetica di depurazione complessiva ($k_2 = \text{pendenza}$) e la concentrazione al tempo 0 ($C_{0,d} = e^{\text{intercept}}$), come indicato in precedenza. Occorre verificare la plausibilità biologica dei valori ottenuti (ad esempio, l'efficienza di assimilazione sotto forma di percentuale non è superiore a 1). (I) è calcolata dividendo la massa degli alimenti per il peso del pesce alimentato ogni giorno (se alimentato al 2 % del suo peso (I) è pari a 0,02). Tuttavia può rendersi necessario adeguare il regime alimentare utilizzato nei calcoli in funzione della crescita degli esemplari (utilizzando la costante cinetica di crescita per stimare il peso del pesce ad ogni campionamento durante la fase di assorbimento; cfr. appendice 7). Nei casi in cui non è possibile ottenere k_2 e $C_{0,d}$ perché, ad esempio, le concentrazioni sono scese al di sotto della soglia di rilevamento al momento del secondo campione di depurazione, si può procedere ad una stima prudente di k_2 e si può calcolare un "limite superiore" di BMF_k (cfr. appendice 7).

Una volta ottenuta l'efficienza di assimilazione (α) si può calcolare il fattore di biomagnificazione moltiplicando α per la costante cinetica di ingestione (I) e dividendola per la costante cinetica di depurazione (globale) (k_2). Il fattore di biomagnificazione corretto dall'effetto di diluizione dovuto alla crescita è calcolato nello stesso modo, ma utilizzando la costante cinetica di depurazione corretta per la crescita (k_{2g} ; cfr. paragrafi 162 e 163). In alternativa, è possibile stimare l'efficienza di assimilazione se sono stati analizzati i tessuti dei pesci prelevati nel corso della fase iniziale, lineare dell'assorbimento (cfr. paragrafo 151 e appendice 7). Tale valore rappresenta una stima indipendente dell'efficienza di assimilazione per un organismo praticamente non esposto (vale a dire il pesce prelevato all'inizio della fase di assorbimento). L'efficienza di assimilazione stimata sulla base dei dati della fase di depurazione è solitamente utilizzata per ottenere il BMF.

Correzione per il tenore di grassi e correzione dalla diluizione dovuta alla crescita

La crescita dei pesci durante la fase di depurazione può ridurre le concentrazioni chimiche misurate nel pesce, aumentando la costante cinetica di depurazione complessiva, k_2 , più di quanto provocherebbero i soli processi di depurazione (es.: metabolismo, egestione) (cfr. paragrafo 72). Il contenuto di liquidi nel pesce di prova (fortemente associato al bioaccumulo delle sostanze chimiche idrofobe) e il contenuto di lipidi degli alimenti possono variare in pratica sufficientemente per richiederne la correzione al fine di ottenere fattori di biomagnificazione significativi. Il fattore di biomagnificazione è corretto dall'effetto di diluizione dovuto alla crescita (come il BCF cinetico nel metodo di esposizione in ambiente acquatico) e corretto per il tenore lipidico degli alimenti in funzione di quello del pesce (il fattore di correzione per i lipidi). Le appendici 5 e 7 presentano le equazioni e forniscono esempi di calcoli di questo tipo.

Per correggere la diluizione della crescita, si deve calcolare la costante cinetica di depurazione corretta per la crescita (k_{2g}) (cfr. appendice 5 per le formule). La costante cinetica di depurazione corretta (k_{2g}) è utilizzata per calcolare il fattore di biomagnificazione corretto per la crescita, come indicato al paragrafo 73. In alcuni casi, tale metodo non è possibile. Un altro metodo che evita la necessità di una correzione della diluizione dovuta alla crescita consiste nell'utilizzare la massa della sostanza in esame per pesce (intero) della depurazione anziché la normale massa della sostanza in esame per unità di massa del pesce (concentrazione). Ciò è facilmente calcolabile, poiché le prove che rispettano il presente metodo devono collegare le concentrazioni registrate nei tessuti al peso del singolo pesce. L'appendice 5 illustra la procedura di calcolo semplice. Si noti che il ricorso a tale metodo alternativo non esonera dalla valutazione e dalla registrazione del valore di k_2 .

Per correggere per il tenore lipidico degli alimenti e del pesce quando l'analisi lipidica non è stata effettuata su tutti i pesci campionati, si calcolano le parti grasse medie (del pesce umido) nel pesce e nei mangimi ⁽¹⁾. Il fattore di correzione per il tenore di grassi (L_c) è calcolato dividendo la parte grassa media del pesce per la parte grassa media di alimenti. Il fattore di biomagnificazione, corretto per la crescita, è diviso per il fattore di correzione per il tenore di grassi al fine di calcolare il fattore di biomagnificazione corretto per i lipidi.

Se l'analisi chimica e l'analisi dei lipidi sono state condotte sullo stesso pesce allo stesso tempo di campionamento è opportuno utilizzare questi dati corretti per i lipidi sui tessuti dei singoli pesci al fine di calcolare direttamente un BMF corretto per i lipidi [cfr. (37)]. La curva della concentrazione corretta in funzione dei lipidi dà $C_{0,d}$ e k_2 . Si può procedere ad un'analisi matematica utilizzando le equazioni nell'appendice 7, ma l'efficienza di assimilazione è calcolata utilizzando la costante cinetica di ingestione normalizzata per il tenore lipidico (I_{lipid}) e la concentrazione nell'alimentazione in funzione dei lipidi ($C_{food-lipid}$). I parametri corretti per il tenore di grassi sono poi impiegati in modo analogo per calcolare il BMF (per calcolare il BMF_{kg} corretto per il tenore di grassi e per la crescita, si applica anche la correzione della costante cinetica di crescita alla parte grassa anziché al peso del pesce umido).

Interpretazione dei risultati

La crescita media del gruppo di prova e del gruppo di controllo non dovrebbe in linea di principio differire molto per escludere effetti tossici. Le costanti cinetiche di crescita o le curve di crescita dei due gruppi vanno confrontate mediante una procedura adeguata ⁽²⁾.

Relazione sulla prova

Dopo il completamento dello studio, occorre redigere una relazione finale contenente le informazioni sulla sostanza in esame, la specie utilizzata e le condizioni di prova di cui al paragrafo 81 (per il metodo di esposizione in ambiente acquatico). Inoltre, la relazione deve includere anche le seguenti informazioni:

- ⁽¹⁾ Questo metodo è specifico per lo studio basato sull'alimentazione e differisce dalla procedura seguita per l'esposizione in ambiente acquatico. Per tale motivo è stato usato il termine "correzione" anziché "normalizzazione" onde evitare confusione — cfr. la nota n. 34.
- ⁽²⁾ Si può eseguire un test t per le costanti cinetiche di crescita, per verificare se la crescita tra i gruppi di controllo e di prova varia, o un test F in caso dell'analisi della varianza. Se necessario, si può utilizzare un test F o test del rapporto di verosimiglianza per facilitare la scelta del modello di crescita adeguato [monografia OCSE n. 54 (32)].

Sostanza in esame:

- Tutte le informazioni sulla stabilità della sostanza in esame negli alimenti preparati;

Condizioni sperimentali:

- La concentrazione nominale della sostanza negli alimenti, la tecnica di arricchimento utilizzata, il quantitativo di mezzo disperdente (lipidi) utilizzato per tale arricchimento (se utilizzato), le concentrazioni della sostanza in esame nell'alimento addizionato per ciascuna analisi (almeno tre campioni prima dell'inizio e alla fine della fase di assorbimento) e i valori medi;
- se utilizzato, il tipo e la qualità dell'olio o del solvente (grado, fabbricante, ecc.) utilizzato per l'arricchimento;
- il tipo di mangime utilizzato (analisi immediata ⁽¹⁾, grado o qualità, fornitore, ecc.), il tasso di somministrazione durante la fase di assorbimento, la quantità di cibo somministrata e la frequenza (compresi gli aggiustamenti in funzione del peso del pesce campionato);
- il momento in cui i pesci sono stati prelevati e soppressi in modo non cruento ai fini dell'analisi chimica di ciascun tempo di campionamento (ad esempio un'ora prima della somministrazione della razione del giorno successivo);

Risultati:

- risultati di eventuali studi preliminari;
- informazioni su eventuali effetti nocivi osservati;
- descrizione completa di tutti i metodi di analisi chimica utilizzati, compreso il limite di rilevabilità e di quantificazione, la variabilità e l'isolamento della sostanza;
- concentrazioni lipidiche misurate negli alimenti (di controllo e addizionati), valori individuali, medie e deviazioni standard;
- tabella del peso (e lunghezze) di ciascun pesce dei gruppi di controllo e di trattamento (ad esempio attribuendo un identificatore unico a ciascun pesce campionato) e calcoli, costante o costanti cinetiche di crescita ottenute e intervallo di confidenza del 95 %;
- tabella delle concentrazioni della sostanza in esame nei pesci, concentrazioni medie misurate alla fine dell'assorbimento ($C_{0,m}$), e costante cinetica di depurazione (globale) ottenuta (k_2) e concentrazione nel pesce all'inizio della fase di depurazione ($C_{0,d}$), nonché le differenze di tali valori (pendenza e intercetta);
- tabella dei tenori lipidici nei pesci (se del caso, con un corrispondente elenco delle concentrazioni specifiche della sostanza), valori medi per i gruppi di controllo e di prova all'inizio della prova, alla fine della fase di assorbimento e alla fine della fase di depurazione;
- curve (comprendenti tutti i dati misurati) con indicazione dei seguenti dati (se del caso, le concentrazioni possono essere espresse per l'animale intero o tessuti specificati dello stesso):
 - la crescita (cioè peso (e lunghezza) del pesce in funzione del tempo) o il peso trasformato in logaritmo naturale in funzione del tempo;
 - la depurazione nel pesce della sostanza in esame; e
 - la concentrazione trasformata in logaritmo naturale (\ln concentrazione) in funzione del tempo di depurazione (ivi compresa la costante cinetica di depurazione ottenuta, k_2 , e la concentrazione nel pesce ottenuta dal logaritmo naturale all'inizio della fase di depurazione, $C_{0,d}$).
- Se sul tracciato si osservano evidenti valori anomali, si può applicare un test per outlier statisticamente valido al fine di eliminare i punti corrispondenti ai dati anomali, la cui omissione dovrà essere debitamente giustificata.

⁽¹⁾ Tecnica di analisi degli alimenti per verificare il tenore di proteine, lipidi, in cellulosa e ceneri. Tali informazioni sono di solito disponibili presso il fornitore.

- Costante cinetica di depurazione calcolata e tempo di dimezzamento corretti per la crescita.
- Efficienza di assimilazione calcolata (α).
- BMF per via alimentare «grezzo», BMF cinetico corretto per i lipidi e per la crescita («grezzo» e corretto per i lipidi in funzione del peso umido totale del pesce), BMF specifico per specifici tessuti, se applicabile.
- Informazioni relative ai metaboliti della sostanza radiomarcata in esame e relativo accumulo.
- Eventuali anomalie concernenti la prova, eventuali deviazioni dalle procedure descritte e ogni altra informazione pertinente;
- Una tabella riepilogativa dei pertinenti dati misurati e calcolati, come di seguito:

Costanti cinetiche di depurazione della sostanza e fattori di biomagnificazione (BMF _k)	
k_g (costante cinetica di crescita; giorno ⁻¹):	Inserire il valore (95 % CI) ⁽¹⁾
k_d (costante cinetica di depurazione complessiva, giorno ⁻¹):	Inserire il valore (95 % CI)
k_{2g} (costante cinetica di depurazione corretta per la crescita; giorno ⁻¹):	Inserire il valore (95 % CI) ⁽¹⁾
$C_{0,m}$ (concentrazione misurata al giorno 0, concentrazione nel pesce alla fine dell'assorbimento) (µg/g):	Inserire il valore ± SD ⁽²⁾
$C_{0,d}$ (concentrazione ottenuta al giorno 0 della fase di depurazione; µg/g):	Inserire il valore ± SD ⁽²⁾
I (tasso di ingestione fisso; g di cibo/g di pesce/giorno):	Inserire il valore
I_g (razione alimentare effettiva, corretta per la crescita; g di cibo/g pesce/giorno) ⁽²⁾	Inserire il valore ± SD ⁽²⁾
C_{food} (concentrazione della sostanza chimica negli alimenti; µg/g):	Inserire il valore ± SD ⁽²⁾
α (efficienza di assimilazione della sostanza):	Inserire il valore ± SD ⁽²⁾
BMF _k (BMF alimentare, cinetico):	Inserire il valore (95 % CI) ⁽¹⁾
BMF _{k_g} (BMF alimentare, cinetico, corretto per la crescita):	Inserire il valore (95 % CI) ⁽¹⁾
$t_{1/2g}$ (tempo di dimezzamento corretto per la crescita, in giorni):	Inserire il valore ± SD ⁽²⁾
L_c (fattore di correzione del tenore lipidico):	Inserire il valore
BMF _{k_{gl}} (BMF cinetico, corretto per la crescita e per i tenore lipidico):	Inserire il valore
BMF _{SS-L} (BMF allo stato stazionario indicativo corretto per il tenore lipidico) ⁽²⁾ :	Inserire il valore ± SD ⁽²⁾

⁽¹⁾ CI: intervallo di confidenza (se possibile stimarlo)

⁽²⁾ SD: Deviazione standard (se possibile stimarla)

BIBLIOGRAFIA

- (1) Capitolo C.13 del presente allegato, Bioconcentrazione: *Saggio sui pesci, metodo a flusso continuo*.
- (2) Capitolo A.6 del presente allegato, Idrosolubilità.
- (3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. *Environ Toxicol Chem* 12: 2031-2035
- (4) Capitolo A.8 del presente allegato, Coefficiente di ripartizione (n-ottanolo/acqua): *Metodo del dibattimento in pallone*.
- (5) Capitolo A.24 del presente allegato, Coefficiente di ripartizione (n-ottanolo/acqua): *Metodo per HPLC*.
- (6) Capitolo A.23 del presente allegato, Coefficiente di ripartizione (1-ottanolo/acqua): *Metodo dell'agitazione lenta*.
- (7) Capitolo C.7 del presente allegato, Idrolisi in funzione del pH.
- (8) (OCSE (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment N. 7: Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water OCDE/GD(97)21. Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico (OCSE), Parigi, Francia.
- (9) Capitolo A.5 del presente allegato, Tensione superficiale di soluzioni acquose.
- (10) Capitolo A.4. del presente allegato, Tensione di vapore.
- (11) Capitolo C.4 del presente allegato, Pronta biodegradabilità.
- (12) Capitolo C.29 del presente allegato, Pronta biodegradabilità — CO₂ in recipienti ermetici.
- (13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Refr. Environ. Contam. Toxicol.* 102: 117-156.
- (14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.
- (15) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
- (16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35: 4097-4102.
- (17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to commercially available pelletized fish food. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2058-2062.
- (18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl. *Toxicol. Sci.* 77: 206-218.
- (19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating in vivo fish bioaccumulation data. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4: 139-155.
- (20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2436-2448.
- (21) Schlechtriem C., Fliedner A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. *Environmental Sciences Europe* 2012, 24:13. published: 3 April 2012.

- (22) Capitolo C.47 del presente allegato, Prova di tossicità sui pesci nei primi stadi di vita.
- (23) Capitolo C.15 del presente allegato, Pesci, prova di tossicità a breve termine sugli stadi di embrione e di larve con sacco vitellino.
- (24) Capitolo C.14 del presente allegato, Test sulla crescita del novellame.
- (25) OECD (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures [ENV/JM/MONO\(2000\)6](#). Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- (26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.
- (27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.
- (28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA
- (29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- (30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. *Limnol. Oceanogr.* 30: 1099-1105.
- (31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst.* 124: 1711-1718.
- (32) OECD (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. [ENV/JM/MONO\(2006\)18](#). Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
- (33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 2271-2280.
- (34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.
- (35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
- (36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.
- (37) Fisk A.T., Cymbalisky C.D., Bergman Å. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of C₁₂- and C₁₆-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1775-1782.
- (38) Anonymous (2004), Fish, dietary bioaccumulation study — Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (39) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, *Toxicol. Environ. Chem.* 7: 173-189.
- (41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. *Chemosphere.* 14: 829-833.

- (42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699-707.
- (43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. *Toxicol. Sci.* 77: 219-229.
- (44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 5: 624-637.
- (45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. *Environ. Sci. Technol.* 29: 2769-2777.
- (46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined in vivo and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 951-961.
- (48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2503-2517.
- (49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.
- (50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. *Environ. Sci. Technol.* 27: 1718-1728.
- (51) OECD (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I — Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II — Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO (2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.
-

Appendice 1

DEFINIZIONI E UNITÀ DI MISURA

L'efficienza di assimilazione (a) misura la percentuale di sostanza assorbita nell'organismo attraverso l'intestino (a non ha unità di misura, ma spesso è espresso in percentuale anziché in frazione).

Il bioaccumulo si riferisce generalmente a un processo in cui la concentrazione della sostanza in un organismo raggiunge un livello superiore a quello riscontrato nell'ambiente circostante (ad esempio, l'acqua per un pesce o l'aria per un mammifero), nella dieta, o entrambi (1).

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

Il fattore di bioconcentrazione (BCF o K_b) in qualsiasi momento della fase di assorbimento di questo saggio di accumulo è la concentrazione della sostanza in esame nel o sul pesce o suoi tessuti specificati (C_f in mg/kg) divisa per la concentrazione della sostanza in esame nell'ambiente circostante (C_w in mg/l). Il BCF è espresso in $l \cdot kg^{-1}$. Si noti che le correzioni per la crescita e/o per il contenuto lipidico non sono prese in considerazione.

La biomagnificazione è l'aumento di concentrazione della sostanza in esame in o su un organismo (o suoi tessuti specificati) rispetto alla concentrazione della sostanza in esame negli alimenti.

Il fattore di biomagnificazione (BMF) è la concentrazione di una sostanza in un predatore rispetto alla concentrazione nella preda (o nell'alimento) allo stato stazionario. Il metodo descritto nel presente metodo di prova evita attentamente l'esposizione attraverso l'ambiente acquatico. Di conseguenza, il BMF ottenuto con tale metodo di prova non è direttamente comparabile con un BMF ottenuto in uno studio sul campo (che consente una combinazione di esposizione in ambiente acquatico e per via alimentare).

Il fattore di biomagnificazione per via alimentare (BMF per via alimentare) è il termine utilizzato nel presente metodo di prova per descrivere il risultato della prova di esposizione per via alimentare, in cui si evita accuratamente l'esposizione per l'ambiente acquatico; il BMF per via alimentare ottenuto con tale metodo non è direttamente comparabile con un BMF ottenuto in uno studio sul campo (che consente una combinazione di esposizione in ambiente acquatico e per via alimentare).

La fase post-esposizione o di depurazione (perdita) è il periodo, successivo al trasferimento del pesce di prova da un ambiente contenente la sostanza in esame ad un ambiente privo di tale sostanza, durante il quale si studia l'eliminazione (o perdita netta) della sostanza dal pesce di prova (o suo tessuto specificato).

La costante cinetica di depurazione (perdita) (k_2) è il valore numerico che definisce la velocità di riduzione della concentrazione della sostanza in esame nel pesce di prova (o suoi tessuti specificati) dopo il trasferimento del pesce di prova da un ambiente contenente la sostanza in esame ad un ambiente privo di tale sostanza (k_2 è espresso in $giorni^{-1}$).

Il carbonio organico disciolto (DOC) è una misura della concentrazione del carbonio proveniente da fonti organiche disciolte nel mezzo di prova.

La fase di esposizione o assorbimento è il periodo durante il quale i pesci sono esposti alla sostanza in esame.

Il tasso di ingestione alimentare (I) corrisponde alla quantità media di cibo consumato da ciascun pesce ogni giorno, rispetto al peso medio totale stimato del pesce (espresso in g di cibo/g di pesce/giorno).

Il fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_k) è il rapporto tra la costante cinetica di assorbimento (k_1) e la costante cinetica di depurazione (k_2 (i.e. k_1/k_2 - cfr. le corrispondenti definizioni nella presente appendice). In linea di principio il valore dovrebbe essere comparabile al BCF_{ss} (cfr. la definizione infra), ma sono possibili differenze se lo stato stazionario era incerto o se al BCF cinetico sono state applicate le correzioni per la crescita).

Il fattore di bioconcentrazione cinetico normalizzato in funzione dei lipidi (BCF_{K_L}) è normalizzato rispetto a un pesce con un contenuto di grassi del 5 %.

Il fattore di bioconcentrazione cinetico corretto per la crescita e normalizzato in funzione dei lipidi ($BCF_{K_{gl}}$) è normalizzato rispetto a un pesce con un contenuto di grassi del 5 % e corretto per la crescita durante il periodo sperimentale, come descritto nell'appendice 5.

Il fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario normalizzato in funzione dei lipidi (BCF_{SSL}) è normalizzato rispetto a un pesce con un contenuto di grassi del 5 %.

Una sostanza multi-componenti è definita ai fini del regolamento REACH come una sostanza che presenta più di un componente principale in concentrazione compresa tra il 10 % e l'80 % (p/p).

Il coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua (K_{ow}) è il rapporto della solubilità di una sostanza in n-ottanolo e in acqua in condizioni di equilibrio [Metodi A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)]; è inoltre espresso come P_{ow} . Il logaritmo di K_{ow} viene usato come indicazione del potenziale di bioconcentrazione di una sostanza da parte di organismi acquatici.

Il carbonio organico particolato (POC) è una misura della concentrazione di carbonio proveniente da fonti organiche sospese nel mezzo.

La microestrazione in fase solida (SPME) è una tecnica analitica che non utilizza solventi sviluppata per sistemi diluiti. In questo metodo una fibra polimerica rivestita è esposta alla fase gassosa o liquida contenente l'analita di interesse. In generale, è imposto un tempo minimo di analisi affinché siano stabilite le condizioni di equilibrio tra le fasi solida e liquida, con riferimento alle specie esaminate. Successivamente, la concentrazione dell'analita di interesse può essere determinata direttamente dalla fibra o dopo averlo estratto dalla fibra con un solvente, a seconda della tecnica di determinazione utilizzata.

Nella rappresentazione grafica della concentrazione della sostanza in esame nei pesci (C_f) in funzione del tempo, lo stato stazionario viene raggiunto quando la curva diventa parallela all'asse del tempo e tre analisi successive di C_f su campioni prelevati ad intervalli di almeno due giorni danno valori che si collocano entro ± 20 % uno dall'altro, e non vi è alcun aumento significativo di C_f nel periodo di tempo trascorso tra la prima e l'ultima analisi successive. Quando si analizzano campioni raggruppati, sono necessarie almeno quattro analisi successive. Per il controllo di sostanze che vengono assorbite lentamente saranno più opportuni intervalli di sette giorni.

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

Il carbonio organico totale (TOC) misura la concentrazione di carbonio proveniente da tutte le fonti organiche nel mezzo di prova, comprese le fonti di particolato e aerosol.

La costante cinetica di assorbimento (k_1) è il valore numerico che definisce la velocità di aumento della concentrazione della sostanza in esame nel o sul pesce di prova (o suoi tessuti specificati) quando il pesce viene esposto a tale sostanza (k_1 è espresso in $l \text{ giorni}^{-1} \text{ kg}^{-1}$).

Le sostanze di composizione sconosciuta o variabile, i prodotti di una reazione complessa e i materiali biologici sono noti come UVCB.

Una sostanza chimica è una sostanza o una miscela.

Una sostanza chimica in esame è qualsiasi sostanza o miscela saggiata seguendo il presente metodo di prova.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

-
- (2) Capitolo A.8 del presente allegato, Coefficiente di ripartizione (n-ottanolo/acqua): *Metodo del dibattimento in pallone*.
 - (3) Capitolo A.24 del presente allegato, Coefficiente di ripartizione (n-ottanolo/acqua): Metodo per HPLC.
 - (4) Capitolo A.23 del presente allegato, Coefficiente di ripartizione (1-ottanolo/acqua): *Metodo dell'agitazione lenta*.
-

Appendice 2

ALCUNE CARATTERISTICHE CHIMICHE DI UN'ACQUA DI DILUIZIONE ACCETTABILE

Componente	Concentrazione limite
Particolato	5 mg/l
Carbonio organico totale	2 mg/l
Ammoniaca non ionizzata	1 µg/l
Cloro residuo	10 µg/l
Pesticidi organofosforati totali	50 µg/l
Pesticidi organoclorurati totali più difenili policlorurati	50 µg/l
Cloro organico totale	25 µg/l
Alluminio	1 µg/l
Arsenico	1 µg/l
Cromo	1 µg/l
Cobalto	1 µg/l
Rame	1 µg/l
Ferro	1 µg/l
Piombo	1 µg/l
Nichel	1 µg/l
Zinco	1 µg/l
Cadmio	100 µg/l
Mercurio	100 µg/l
Argento	100 µg/l

Appendice 3

SPECIE ITTICHE RACCOMANDATE PER LA PROVA

Specie raccomandata	Intervallo di temperatura raccomandato per la prova (°C)	Lunghezza totale raccomandata dell'animale di prova (cm) ⁽²⁾
<i>Danio rerio</i> ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Danio zebrato	20 — 25	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead minnow	20 — 25	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Carpa commune	20 — 25	8,0 + 4,0 ⁽³⁾
<i>Orvzias latipes</i> (Teleostei, poeciliidae) (Temminck e Schlegel) Medaka	20 — 25	4,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy	20 — 25	3,0 ± 1,0
<i>Menidia macrochirus</i> (Teleostei centrarchidae) (Rafinesque) Bluegill	20 — 25	5,0 ± 2,0
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Teleostei salmonidi) (Walbaum) Trota iridea	13 — 17	8,0 ± 4,0
<i>Gasterosteus aculeatus</i> (Teleostei, (gasterosteidae) (Linnaeus) Spinarello	18 — 20	3,0 ± 1,0

⁽¹⁾ Meyer et al. (1)

⁽²⁾ Durante la prova stessa, è preferibile utilizzare il peso per misurare le derivazioni delle costanti cinetiche di crescita. Si riconosce tuttavia che la lunghezza è una misura più pratica se i pesci devono essere selezionati a vista all'inizio dell'esperimento (all'interno della popolazione dello stock ittico).

⁽³⁾ Tale intervallo di lunghezze è riportato nel documento *Testing Methods for New Chemical Substances* ecc., basato sulla legislazione relativa al controllo delle sostanze chimiche del Giappone (CSCL).

Varie specie di estuario e marine sono meno utilizzate, ad esempio:

Corvina striata	(<i>Leiostomus xanthurus</i>)
Sheepshead minnow	(<i>Cyprinodon variegatus</i>)
Latterino	(<i>Menidia beryllina</i>)
Shiner perch	(<i>Cymatogaster aggregata</i>)
Sogliola limanda del Pacifico	(<i>Parophrys vetulus</i>)
Staghorn sculpin	(<i>Leptocottus armatus</i>)
Spinarello	(<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
Spigola	(<i>Dicentracus labrax</i>)
Alborelle	(<i>Alburnus alburnus</i>)

I pesci d'acqua dolce suelencati sono facilmente allevabili e/o sono largamente disponibili per tutto l'anno, mentre la disponibilità delle specie marine e di estuario è parzialmente confinata ai rispettivi paesi. Possono riprodursi e venire allevati sia in stabilimenti di acquicoltura sia in laboratorio, in condizioni di controllo delle malattie e dei parassiti, in modo che gli animali di prova siano sani e geneticamente controllati. Questi pesci sono disponibili in molte parti del mondo.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.
-

Appendice 4

PROGRAMMA DI CAMPIONAMENTO PER LE PROVE DI ESPOSIZIONE PER VIA ALIMENTARE IN AMBIENTE ACQUATICO

1. Esempio teorico di un programma di campionamento per una prova di bioconcentrazione con esposizione esclusivamente in ambiente acquatico su una sostanza con $\log K_{ow} = 4$.

Campionamento del pesce	Programma di campionamento		Numero di campioni d'acqua ⁽¹⁾	Numero di pesci per campione ⁽¹⁾
	Frequenza minima richiesta (giorni) ⁽²⁾	Campionamento supplementare (giorni) ⁽²⁾		
Fase di assorbimento				
1	-1		2 ⁽³⁾	4 ⁽⁴⁾
	0		(2)	(3 ⁽⁶⁾)
2	0,3		2	4
		0,4	(2)	(4)
3	0,6		2	4
		0,9	(2)	(4)
4	1,2		2	4
		1,7	(2)	(4)
5	2,4		2	4
		3,3	(2)	(4)
6	4,7		2	4 – 8 ⁽⁵⁾
				(3 ⁽⁶⁾)
Fase di depurazione				Trasferire il pesce in acqua priva della sostanza in esame
7	5,0		2	4
		5,3		(4)
8	5,9		2	4
		7,0		(4)
9	9,3		2	4
		11,2		(4)

Campionamento del pesce	Programma di campionamento		Numero di campioni d'acqua ⁽¹⁾	Numero di pesci per campione ⁽¹⁾
	Frequenza minima richiesta (giorni) ⁽²⁾	Campionamento supplementare (giorni) ⁽²⁾		
Fase di assorbimento				
10	14,0		2	4 – 8 ⁽⁵⁾
		17,5		(4 + 3 ⁽⁶⁾)
TOTALE				40 – 72 (48 – 80) ⁽⁵⁾

⁽¹⁾ I valori tra parentesi corrispondono al numero di campioni (acqua, pesce) da prelevare se si esegue un campionamento supplementare.

⁽²⁾ La stima preliminare di k_2 di una sostanza con $\log K_{ow} = 4.0$ è di $0.652 \text{ giorni}^{-1}$. La durata totale dell'esperimento è imposta su $3 \times t_{ss} = 3 \times 4.6$, cioè 14 giorni. Per la stima di t_{ss} cfr. appendice 5.

⁽³⁾ Prelevare un campione di acqua dopo che è stato versato l'equivalente del volume di almeno tre recipienti di prova.

⁽⁴⁾ Questi pesci sono prelevati dallo stock ittico.

⁽⁵⁾ Se è necessaria una maggiore precisione su studi di metabolismo che richiedono un maggior numero di pesci, questi devono essere campionati specificamente alla fine delle fasi di assorbimento e di depurazione (cfr. paragrafo 40).

⁽⁶⁾ Almeno altri 3 pesci potranno essere necessari per analizzare il contenuto di grassi se non è possibile utilizzare i pesci prelevati per misurare le concentrazioni della sostanza in esame all'inizio della prova, alla fine della fase di assorbimento e alla fine della fase di depurazione. Nota dovrebbe essere possibile in molti casi utilizzare solo i 3 pesci di controllo (cfr. paragrafo 56).

2. Esempio teorico di un programma di campionamento per prova di bioaccumulo della sostanza per via alimentare con fasi di assorbimento e di depurazione, rispettivamente, di 10 e 42 giorni.

Campionamento di pesci	Programma di campionamento		Numero di campioni di alimenti	Numero di pesci per campione	
	Giorno della fase	Ulteriori campioni di pesce?		Gruppo di prova	Gruppo di controllo
Fase di assorbimento					
1	0	Possibile ⁽¹⁾ ⁽²⁾	3 — gruppo di prova	0	5 — 10
			3 — gruppo di controllo ⁽¹⁾		(8 – 13) ⁽²⁾
1A ⁽³⁾	1-3			5 — 10	5 — 10
2	10	Si ⁽⁴⁾	3 — gruppo di prova	10 — 15 ⁽⁴⁾	5 — 10
			3 — gruppo di controllo ⁽¹⁾	(13 – 18) ⁽⁵⁾	(8-13) ⁽⁵⁾
Fase di depurazione					
3	1	Si ⁽⁴⁾		10 — 15 ⁽⁴⁾	5 — 10
4	2			5 — 10	5 — 10
5	4			5 — 10	5 — 10

Campionamento di pesci	Programma di campionamento		Numero di campioni di alimenti	Numero di pesci per campione	
	Giorno della fase	Ulteriori campioni di pesce?		Gruppo di prova	Gruppo di controllo
Fase di assorbimento					
6	7	Si ⁽⁴⁾		10 — 15 ⁽⁴⁾	5 — 10
7	14			5 — 10	5 — 10
8	28			5 — 10	5 — 10
9	42	Si ⁽⁴⁾		10 — 15 ⁽⁴⁾ (13-18) ⁽⁵⁾	5 — 10 (8-13) ⁽⁵⁾
TOTALE				59 — 120 (63-126) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾	50 — 110 (56-116) ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾

(¹) Tre campioni di alimenti sia dei gruppi di controllo sia dei gruppi di prova sono analizzati per misurare le concentrazioni della sostanza in esame e il contenuto di lipidi.

(²) I pesci vengono prelevati a fini di campionamento dallo stock il più tardi possibile prima dell'inizio dello studio; almeno tre esemplari di tale stock sono prelevati all'inizio della prova per misurare il tenore di grassi.

(³) Il campionamento (facoltativo) all'inizio della fase di assorbimento fornisce i dati necessari per calcolare l'assimilazione della sostanza in esame consumata per via alimentare, che si può paragonare all'efficienza di assimilazione calcolata a partire dai dati ottenuti nel corso della fase di depurazione.

(⁴) Si possono prelevare cinque pesci supplementari per l'analisi dei tessuti specifici.

(⁵) Almeno tre esemplari supplementari potranno essere necessari per analizzare il contenuto di grassi se non è possibile utilizzare i pesci prelevati per misurare le concentrazioni della sostanza in esame all'inizio della prova, alla fine della fase di assorbimento e alla fine della fase di depurazione. È opportuno precisare che dovrebbe essere possibile in molti casi utilizzare solo i 3 pesci di controllo (cfr. paragrafi 56 e 153).

Nota relativa alla durata delle fasi e ai tempi di campionamento: la fase di assorbimento inizia con la prima razione di mangimi addizionati. Il primo giorno di prova inizia con la prima somministrazione di cibo e termina subito prima della successiva, 24 ore più tardi. Il primo campionamento (1 nella tabella) dovrebbe avvenire poco prima della somministrazione di cibo (un'ora prima, ad esempio). Idealmente, si dovrebbe ogni volta prelevare i pesci immediatamente prima della razione del giorno successivo (circa 23 ore dopo l'ultima razione). La fase di assorbimento termina subito prima della somministrazione di mangimi non addizionati, quando comincia la fase di depurazione (è probabile che i pesci del gruppo di prova stiano ancora digerendo gli alimenti addizionati nelle 24 ore dall'ultima somministrazione di mangime addizionato). Ciò significa che l'ultimo prelievo della fase di assorbimento avviene poco prima della somministrazione del mangime non addizionato, e il primo campionamento della fase di depurazione è eseguito circa 23 ore dopo la prima razione di mangimi non addizionati.

Appendice 5

CALCOLI GENERALI

1. Introduzione
2. Previsione della durata della fase di assorbimento
3. Previsione della durata della fase di depurazione
4. Metodo sequenziale: determinazione della *costante cinetica* di depurazione (perdita) k_2
5. Metodo sequenziale: determinazione della *costante cinetica* di *assorbimento* k_1 (solo metodo di esposizione in ambiente acquatico)
6. Metodo di calcolo simultaneo delle costanti cinetiche di assorbimento e depurazione (perdita) (solo metodo di esposizione in ambiente acquatico)
7. Correzione per la diluizione causata dalla crescita per il BCF e il BMF cinetici
8. Normalizzazione dei grassi al 5 % del tenore di grassi (solo metodo di esposizione in ambiente acquatico)

1. INTRODUZIONE

Il modello generale di bioaccumulo in ambiente acquatico nei pesci può essere descritto in termini di processo di assorbimento e di perdita, ignorando l'assunzione alimentare. L'equazione differenziale (dC_f/dt) che descrive il tasso di variazione della concentrazione nel pesce ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{giorno}^{-1}$) è data da (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad [\text{equazione A5.1}]$$

Dove

k_1 = costante cinetica di primo ordine per l'assorbimento nei pesci ($\text{l}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{giorno}^{-1}$).

k_2 = costante cinetica di primo ordine per la depurazione della sostanza nei pesci (giorno^{-1}).

k_g = costante cinetica di primo ordine per la crescita del pesce (effetto di diluizione dovuto alla crescita) (giorno^{-1})

k_m = costante cinetica di primo ordine per la trasformazione metabolica (giorno^{-1})

k_e = costante cinetica di primo ordine per l'egestione degli escrementi (giorno^{-1})

C_w = concentrazione nell'acqua ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

C_f = concentrazione nel pesce ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ di peso umido).

Per quanto riguarda sostanze bioaccumulabili, si può prevedere che un valore medio ponderato nel tempo (TWA) sia la concentrazione di esposizione nell'acqua (C_w) all'interno dell'intervallo di fluttuazione autorizzato (cfr. paragrafo 24). Si raccomanda di calcolare una media ponderata rispetto al tempo della concentrazione in acqua secondo le istruzioni fornite nell'appendice 6 del metodo di prova C.20 (2). Si noti che il logaritmo naturale della concentrazione in acqua è adeguato quando si prevede un declino esponenziale tra i periodi di rinnovo, ad esempio in condizioni di prova semistatiche. Con un sistema dinamico, la trasformazione in logaritmo naturale delle concentrazioni di esposizione non è sempre necessaria. Se si ottiene una media ponderata nel tempo della concentrazione in acqua, è opportuno registrarla e utilizzarla per i calcoli successivi.

In una prova BCF standard eseguita sui pesci, l'assorbimento e la depurazione possono essere descritti in termini di due processi cinetici di primo ordine.

$$\text{Cinetica di assorbimento} = k_1 \times C_w \quad [\text{equazione 5.2}]$$

$$\text{Cinetica di eliminazione globale} = (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \quad [\text{equazione A5.3}]$$

Allo stato stazionario, in un'ipotesi di crescita e metabolismo trascurabili (i valori per k_g e k_m non sono distinguibili da zero), la cinetica di assorbimento è uguale alla cinetica di depurazione, e quindi combinando le equazioni A5.2 e A5.3 si ottiene la seguente relazione:

$$BCF = \frac{C_f - ss}{C_w - ss} = \frac{k_1}{k_2} \quad [\text{equazione A5.4}]$$

Dove

C_{f-ss} = concentrazione nel pesce allo stato stazionario (mg kg⁻¹ di peso umido).

C_{w-ss} = concentrazione in acqua allo stato stazionario (mg L⁻¹).

Il rapporto k_1/k_2 è noto come fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_k) e dovrebbe essere pari al valore del fattore di bioconcentrazione (BCF) allo stato stazionario (BCF_{ss}) ottenuto dal rapporto tra la concentrazione allo stato stazionario nel pesce e la concentrazione allo stato stazionario in acqua, ma variazioni sono possibili se lo stato stazionario è incerto o se correzioni per la crescita sono state applicate al BCF. Tuttavia, una volta che k_1 e k_2 sono costanti, non è necessario che venga raggiunto lo stato stazionario per ottenere un BCF_k .

Sulla base di queste equazioni di primo ordine, la presente appendice 5 riporta le operazioni generali di calcolo necessarie per i due metodi di bioaccumulo, con esposizione in ambiente acquatico e esposizione per via alimentare. Tuttavia, le sezioni 5, 6 e 8 sono rilevanti solo per il metodo di esposizione in ambiente acquatico, ma sono state qui riportate come "tecniche generali". I metodi sequenziali (sezioni 4 e 5) e simultaneo (sezione 6) permettono di calcolare le costanti di assorbimento e di depurazione che servono a ottenere i BCF cinetici. Il metodo sequenziale per calcolare k_2 (sezione 4) è importante per l'esposizione per via alimentare, in quanto necessario per calcolare l'efficienza di assimilazione e il BMF. L'appendice 7 illustra in dettaglio i calcoli specifici per il metodo di esposizione per via alimentare.

2. PREVISIONE DELLA DURATA DELLA FASE DI ASSORBIMENTO

Prima di eseguire la prova, si può ricavare una stima di k_2 e quindi di una data percentuale del tempo occorrente per arrivare allo stato stazionario da relazioni empiriche tra k_2 e il coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua (K_{ow}) o tra k_1 e il BCF. Si dovrebbe essere, tuttavia, consapevoli che le equazioni in questa sezione sono applicabili unicamente quando l'assorbimento e la depurazione seguano una cinetica di primo ordine. Se ciò non è evidentemente il caso, si raccomanda di chiedere il parere di un esperto in biostatistica e/o farmacocinetica, per stabilire se le previsioni della durata della fase di assorbimento sono auspicabili.

Una stima di k_2 (giorni⁻¹) si può ottenere con diversi metodi. Ad esempio, le seguenti relazioni empiriche possono essere utilizzate in primo luogo: ⁽¹⁾

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \log K_{ow} \quad (r^2 = 0,95) [(3); \text{Equazione A5.5}]$$

oppure

$$k_2 = \frac{k_1}{BCF} \quad [\text{equazione A5.6}]$$

$$\text{Dove } k_1 = 520 \times W^{-0,32} \text{ (per le sostanze con } \log K_{ow} > 3) \quad (r^2 = 0,85) [(4); \text{equazione A5.7}]$$

$$\text{e } BCF = 10^{(0,910 \cdot \log K_{ow} - 1,975 \cdot \log(6,8 \cdot 10^{-7} K_{ow} + 1) - 0,786)} \quad (r^2 = 0,90) [(5) \text{equazione A5.8}]$$

⁽¹⁾ Come per ogni relazione empirica, occorre verificare che la sostanza rientri nel campo di applicabilità della relazione.

W = media del peso del pesce trattato (in grammi di pesce umido) alla fine dell'assorbimento/inizio di depurazione ⁽¹⁾

Per altre relazioni associate, cfr. (6). Può essere utile impiegare modelli più complessi per ricavare una stima di k_2 se, ad esempio, è probabile che si verifichi un metabolismo significativo (7) (8). Tuttavia, a causa della maggiore complessità del modello, si provvederà a prestare particolare attenzione all'interpretazione delle previsioni. Pertanto, la presenza di gruppi nitrici potrebbe indicare un metabolismo rapido, ma non è sempre questo il caso. Pertanto, l'utente deve ponderare i risultati con metodi predittivi sulla base della struttura chimica e ogni altra informazione pertinente (ad esempio studi preliminari) nella programmazione di uno studio.

Il tempo necessario per raggiungere una certa percentuale dello stato stazionario si può ricavare, applicando la stima k_2 , dall'equazione cinetica generale che descrive l'assorbimento e la depurazione (cinetica di primo ordine), nell'ipotesi di crescita e metabolismo trascurabili. Se si verifica una crescita sostanziale nel corso dello studio, le stime indicate di seguito non saranno attendibili. In tale caso, è meglio utilizzare il valore k_2 corretto per la crescita come descritto più avanti (cfr. sezione 7 della presente appendice):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_w - k_2 C_f \quad \text{[equazione A5.9]}$$

o, se C è costante:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{[equazione A5.10]}$$

Approssimandosi allo stato stazionario, ($t \rightarrow \infty$), l'equazione A5.10 può essere ridotta a (cfr. (9) (10)):

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad \text{[equazione A5.11]}$$

oppure

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = BCF \quad \text{[equazione A5.12]}$$

$BCF \times C_w$ è pertanto un'approssimazione della concentrazione nel pesce allo stato stazionario ($C_{f,ss}$). [Nota: Lo stesso approccio può essere usato per calcolare il BMF allo stato stazionario durante una prova con esposizione per via alimentare. In tal caso, il valore BCF è sostituito dal BMF, e la C_w dal C_{food} , la concentrazione negli alimenti, nelle equazioni di cui sopra.]

L'equazione A5.10 può essere riformulata come segue:

$$C_f = C_{f-ss} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{[equazione A5.13]}$$

oppure

$$\frac{C_f}{C_{f-ss}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad \text{[equazione A5.14]}$$

Applicando l'equazione A5.14, il tempo necessario per raggiungere una certa percentuale dello stato stazionario si può prevedere quando k_2 sia stato pre-stimato mediante l'equazione A5.5 o A5.6.

A titolo indicativo, la durata statisticamente ottimale della fase di assorbimento per ottenere dati statisticamente accettabili (BCF_k) è il periodo necessario perché la curva del logaritmo della concentrazione della sostanza in esame nel pesce in funzione del tempo raggiunga almeno il 50 % dello stato stazionario ($0.69/k_2$), e non più del 95 % dello stato stazionario ($3.0/k_2$) (11). Se l'accumulo supera il 95 % dello stato stazionario, il calcolo del BCF_{ss} diventa possibile.

⁽¹⁾ Il peso del pesce alla fine della fase di assorbimento può essere stimato sulla base dei dati di uno studio precedente o conoscenze sulla specie in esame, di cui è noto il probabile aumento delle dimensioni in base al peso all'inizio della prova abituale e per una durata di assorbimento abituale (ad es. 28 giorni).

Il tempo necessario per raggiungere l'80 % dello stato stazionario si ottiene da (equazione A5.14):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t} \quad \text{[equazione A5.15]}$$

oppure

$$t_{80} = \frac{-\ln(0,20)}{k_2} = \frac{1,6}{k_2} \quad \text{[equazione A5.16]}$$

Analogamente il tempo necessario per raggiungere il 95 % dello stato stazionario si ottiene da:

$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2} \quad \text{[equazione A5.17]}$$

A titolo di esempio, la durata della fase di assorbimento (cioè il tempo necessario all'ottenimento di una certa percentuale dello stato stazionario, ad esempio t_{80} o t_{95}) di una sostanza in esame con $\log K_o/w = 4$ raggiungerebbe (utilizzando le equazioni A5.5, A5.16 e A5.17):

$$\log k_2 = 1,47 - 0,414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0,652 \text{ giorni}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1,6}{0,652} = 2,45 \text{ giorni (59 ore)}$$

$$\text{oppure } t_{95} = \frac{3,0}{0,652} = 4,60 \text{ giorni (110 ore)}$$

In alternativa, si può utilizzare l'espressione:

$$t_{\text{eSS}} = 6,54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{\text{ow}} + 55,31 \text{ (hours)} \quad \text{[equazione A5.18]}$$

per calcolare il tempo affinché uno stato stazionario efficace (t_{eSS}) possa essere raggiunto (12). Per una sostanza in esame con $\log K_{\text{ow}} = 4$ ciò comporta, infatti:

$$t_{\text{eSS}} = 6,54 \cdot 10 - 3 \cdot 104 + 55,31 = 121 \text{ hours}$$

3. PREVISIONE DELLA DURATA DELLA FASE DI DEPURAZIONE

Una previsione del tempo necessario per ridurre il carico corporeo ad una certa percentuale della concentrazione iniziale si può ricavare anch'essa dall'equazione generale che descrive l'assorbimento e la depurazione (presupponendo una cinetica di primo ordine (cfr. equazione A5.9 (1) (13)).

Per la fase di depurazione, si assume che C_w (o C_{food} per la prova di esposizione per via alimentare) sia pari a zero. L'equazione si può ridurre a:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \quad \text{[equazione A5.19]}$$

oppure

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \quad \text{[equazione A5.20]}$$

dove $C_{f,0}$ è la concentrazione all'inizio del periodo di depurazione.

50 per cento di depurazione verrà allora raggiunta al tempo (t_{50}):

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

oppure

$$t_{50} = \frac{-\ln(0,50)}{k_2} = \frac{0,693}{k_2}$$

Analogamente il 95 % di depurazione verrà raggiunto a:

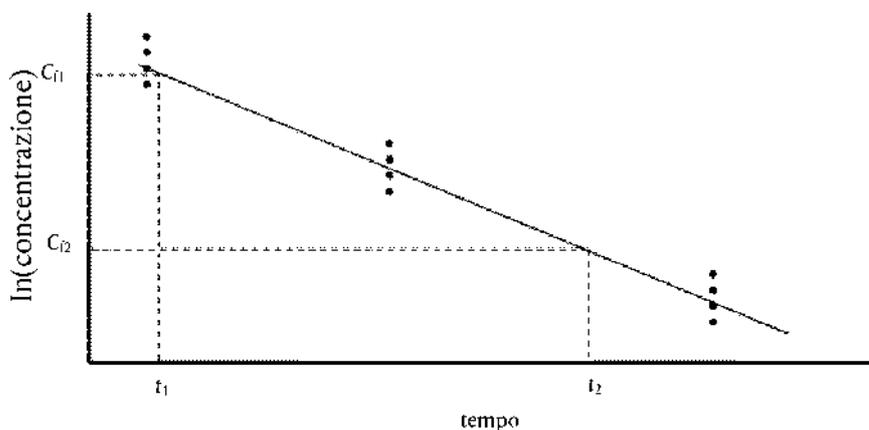
$$t_{95} = \frac{-\ln(0,05)}{k_2} = \frac{3,0}{k_2}$$

Se si usa un assorbimento dell'80 % per il primo periodo ($1.6/k_2$) e una perdita del 95 % nella fase di depurazione ($3.0/k_2$), la fase di depurazione sarà pari a circa il doppio della durata della fase di assorbimento.

Occorre osservare che le stime si basano sull'ipotesi secondo cui il processo di assorbimento e di depurazione segue una cinetica di primo ordine. Se tali procedimenti non rispondono manifestamente a una cinetica di primo ordine, tali stime non sono valide.

4. METODO SEQUENZIALE: DETERMINAZIONE DELLA COSTANTE CINETICA DI DEPURAZIONE (PERDITA) K_2

Si è ipotizzato che la maggior parte dei dati riguardanti la bioconcentrazione fossero "ragionevolmente" ben descritti mediante un semplice modello a due compartimenti e due parametri, come indicato dalla curva rettilinea che approssima i punti che rappresentano la concentrazione nel pesce (su un grafico logaritmico), durante la fase di depurazione.



Si noti che le deviazioni dalla linea retta possono indicare uno schema di depurazione più complesso di una cinetica di primo ordine. Il metodo grafico può essere applicato per risolvere i tipi di depurazione che si discostano dalla cinetica di primo ordine.

Per calcolare k_2 per multipli punti (di campionamento) nel tempo, effettuare una regressione lineare del logaritmo naturale della concentrazione in funzione del tempo. Il coefficiente angolare della linea di regressione è una stima di k_2 , la costante cinetica di depurazione (¹⁾). Dall'ordinata, la concentrazione media nel pesce all'inizio della fase di depurazione ($C_{0,D}$; che è pari alla media delle concentrazioni nel pesce alla fine della fase di assorbimento), può essere facilmente calcolata (compresi i margini di errore) (¹⁾):

$$C_{0,d} = e^{\text{intercept}}$$

[equazione A5.21]

(¹) Nella maggior parte dei programmi che consentono una regressione lineare, sono forniti anche gli errori standard e l'intervallo di confidenza (IC) delle stime, ad esempio in Microsoft Excel utilizzando i dati dello strumento di analisi Pack.

Per calcolare k_2 quando sono disponibili solo due punti di (campionamento) nel tempo (come nella prova ridotta), sostituire le due concentrazioni medie nell'equazione:

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}) - \ln(C_{f2})}{t_2 - t_1} \quad \text{[equazione A5.22]}$$

Dove $\ln(C_{f1})$ e $\ln(C_{f2})$ sono i logaritmi naturali delle concentrazioni rispettivamente ai tempi t_1 e t_2 e t_2 e t_1 sono i momenti in cui i due campioni sono stati raccolti in relazione all'inizio della depurazione ⁽¹⁾.

5. METODO SEQUENZIALE: DETERMINAZIONE DELLA COSTANTE CINETICA DI ASSORBIMENTO k_1 (SOLO NEL METODO DI ESPOSIZIONE IN AMBIENTE ACQUATICO)

Per trovare un valore di k_1 data una serie di valori sequenziali della concentrazione in funzione del tempo per la fase di assorbimento, occorre utilizzare un programma informatico che corrisponda al seguente modello:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{[equazione A5.23]}$$

Quando k_2 è dato dal precedente calcolo, $C_f(t)$ e $C_w(t)$ sono le concentrazioni nel pesce e nell'acqua, rispettivamente, al tempo t .

Per calcolare k_1 quando sono disponibili solo due punti di (campionamento) nel tempo (come nella prova ridotta), si utilizza la formula seguente:

$$k_1 = \frac{C_f \cdot k_2}{C_w(1 - e^{-k_2 t})} \quad \text{[equazione A5.24]}$$

Quando k_2 è dato dal precedente calcolo, C_f è la concentrazione nel pesce all'inizio della fase di depurazione e C_w è la concentrazione media in acqua durante la fase di assorbimento ⁽²⁾.

Per valutare la bontà di adattamento, si può procedere ad un'ispezione visiva delle pendenze k_1 e k_2 rispetto ai valori misurati ai tempi di campionamento riportati nel grafico. Se risulta che il metodo sequenziale ha fornito una scarsa stima di k_1 , è opportuno applicare il metodo simultaneo per calcolare k_1 e k_2 (cfr. sezione 6 in appresso). Ancora in questo caso, per valutare la bontà di adattamento, è necessario paragonare visivamente le pendenze ottenute con i valori misurati contenuti nel grafico. Se l'adattamento non è ancora soddisfacente, ciò può significare che la cinetica di primo ordine non si applica e che occorre impiegare modelli più complessi.

6. METODO DI CALCOLO SIMULTANEO DELLE COSTANTI CINETICHE DI ASSORBIMENTO E DEPURAZIONE (PERDITA) (SOLO METODO DI ESPOSIZIONE IN AMBIENTE ACQUATICO)

È possibile utilizzare i programmi informatici per calcolare i valori di k_1 e k_2 data una serie di valori sequenziali della concentrazione in funzione del tempo e il modello:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[equazione A5.25]}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad \text{[equazione A5.26]}$$

dove

t_c = tempo al termine della fase di assorbimento.

⁽¹⁾ Contrariamente al metodo di regressione lineare, questa formula non darà generalmente un errore standard di k_2 .

⁽²⁾ In contrasto con una procedura di approssimazione, questo metodo lineare di solito non genera un errore standard o intervallo di confidenza per la stima di k_1 .

Tale approccio fornisce direttamente errori standard per le stime di k_1 e k_2 . Se k_1/k_2 è sostituita dal BCF (cfr. equazione A5.4) nelle equazioni A5.25 e A5.26, è possibile stimare l'errore standard e l'intervallo di confidenza del 95 % del fattore di bioconcentrazione (BCF). Ciò è particolarmente utile per comparare le stime diverse derivanti dalla trasformazione dei dati. La variabile dipendente (concentrazione nel pesce) può essere adattata con o senza trasformazione in logaritmo naturale, e si può valutare l'incertezza circa il BCF ottenuto.

A causa della forte correlazione tra i due parametri, k_1 e k_2 , se sono stati stimati simultaneamente, si consiglia di calcolare anzitutto k_2 dai risultati della depurazione (cfr. sopra). Nella maggior parte dei casi, k_2 può essere stimato a partire dalla curva di depurazione con una precisione relativamente elevata. Successivamente, k_1 può essere calcolato a partire dai dati di assorbimento con una regressione non lineare ⁽¹⁾. Si raccomanda di trasformare i dati nello stesso modo in caso di adattamento sequenziale.

Per valutare la bontà di adattamento, si può procedere ad un'ispezione visiva delle pendenze ottenute riportando su un grafico i dati misurati al tempo di campionamento. Se risulta che tale metodo fornisce una stima scarsa di k_1 , occorre applicare il metodo alternativo per calcolare k_1 e k_2 . Anche in questo caso, per valutare la bontà di adattamento, si dovrebbe comparare visivamente il modello adeguato ai dati misurati contenuti nel grafico, e le stime dei parametri per k_1 , k_2 e il BCF ottenuto nonché i loro errori standard e/o gli intervalli di fiducia devono essere confrontati tra diversi tipi di adattamento.

Se la bontà di adattamento non è ancora soddisfacente, ciò può significare che la cinetica di primo ordine non si applica e che occorre impiegare modelli più complessi. Una delle complicazioni più comuni è la crescita del pesce durante la prova.

7. CORREZIONE DELL'EFFETTO DI DILUIZIONE DOVUTO ALLA CRESCITA PER IL BCF CINETICO E IL BMF

La presente sezione descrive un metodo standard per la correzione dovuta alla crescita dei pesci durante la prova (il cosiddetto "effetto di diluizione dovuto alla crescita") che vale solo quando si applica una cinetica di primo ordine. Se non si applica la cinetica di primo ordine, si consiglia di rivolgersi ad un esperto di biostatistica per correggere i dati dell'effetto di diluizione dovuto alla crescita o di utilizzare l'approccio basato sulla massa descritti di seguito.

In alcuni casi, tale metodo di correzione dell'effetto di diluizione della crescita manca di precisione o non funziona (ad esempio, per sostanze testate che si eliminano molto lentamente nei pesci in rapida crescita, la costante cinetica di depurazione corretta per la crescita, k_{2g} , può essere molto modesta, e quindi l'errore nelle due costanti cinetiche usate per calcolarlo è cruciale, e in alcuni casi il valore k_g stimato può essere superiore a k_2). È possibile utilizzare un altro metodo (approccio di massa), che evita di apportare eventuali correzioni e opera anche in assenza di una cinetica di primo ordine. Questo metodo è presentato alla fine della presente sezione.

Metodo di correzione della crescita mediante sottrazione della costante cinetica di crescita

In base alla metodologia standard, i pesi e le lunghezze individuali sono convertiti in logaritmi naturali e \ln (peso) o \ln (1/ peso) sono riportati graficamente in funzione del tempo (giorno) in due grafici distinti per i gruppi di controlli e il gruppo di prova. Si procede analogamente con i dati ottenuti separatamente per le fasi di assorbimento e di depurazione. In generale, per correggere gli effetti di diluizione dovuto alla crescita, è più opportuno fare riferimento al peso dell'insieme dello studio per ottenere la costante cinetica di crescita (k_g), ma differenze statisticamente significative tra le costanti cinetiche di crescita sia per la fase di assorbimento sia per la fase di depurazione possono far ritenere opportuno usare la costante cinetica della fase di depurazione. I tassi di crescita globali osservati in studi con esposizione in ambiente acquatico per i gruppi di controllo e di prova possono essere utilizzati per accertare eventuali effetti correlati al trattamento.

⁽¹⁾ Occorre tener conto del fatto che l'incertezza nella stima di k_2 non è utilizzata adeguatamente nel modello di bioaccumulo quando è essenzialmente considerata come costante continua quando si adatta k_1 con il metodo sequenziale. L'incertezza circa il BCF ottenuto sarà, perciò, differente a seconda che si applica il metodo di adattamento simultaneo o sequenziale.

Una correlazione dei minimi quadrati lineari è calcolata per \ln (peso del pesce) in funzione del tempo (giorno) (\ln (1/ peso) in funzione del tempo per ciascun gruppo (gruppi di prova e di controllo, dati individuali, medie non giornaliere) per l'intero studio, le fasi di assorbimento e di depurazione applicando i metodi statistici standard. Le variazioni delle pendenze delle linee sono calcolate e utilizzate per valutare la significatività statistica ($p = 0,05$) della differenza tra le pendenze (costanti cinetiche di crescita) utilizzando il test t (o di ANOVA se sono testate più di una concentrazione). Si preferisce generalmente utilizzare i dati sul peso per le correzioni per la crescita. Le lunghezze, trattate allo stesso modo, possono essere usate per valutare gli effetti del trattamento su gruppi di controllo e di prova. Se non si rileva alcuna differenza statisticamente significativa nell'analisi dei dati sul peso, si possono raggruppare i dati dei gruppi di controllo e di prova e calcolare la costante cinetica di crescita del pesce globale per lo studio (k_g) vale a dire la pendenza globale della correlazione lineare. Se si osservano differenze statisticamente significative, si registrano separatamente le costanti cinetiche di crescita per ciascun gruppo di pesci e/o ciascuna fase della prova. La costante cinetica per ciascun gruppo trattato viene utilizzata per le correzioni dell'effetto di diluizione dovuto alla crescita in questo gruppo. Se vi sono differenze statistiche tra le costanti cinetiche di assorbimento e di depurazione, si usano le costanti cinetiche ricavate dalla fase di depurazione.

La costante cinetica di crescita calcolata (k_g espresso in giorni⁻¹) può essere dedotta dalla costante cinetica di depurazione complessiva (k_2) per garantire la costante cinetica di depurazione, k_{2g} .

$$k_{2g} = k_2 - k_g \quad \text{[equazione A5.27]}$$

Suddividendo la costante cinetica di assorbimento per la costante cinetica di depurazione corretta per la crescita per ottenere il fattore di bioconcentrazione cinetico corretto per l'effetto di diluizione dovuto alla crescita, denominato BCF_{k_g} (o BMF_{k_g}).

$$BCF_{k_g} = \frac{k_1}{k_{2g}} \quad \text{[equazione A5.28]}$$

La costante cinetica di crescita ottenuta per una prova con esposizione per via alimentare è utilizzata nell'equazione A7.5 per calcolare il BMF_{k_g} corretto per la crescita (cfr. appendice 7).

Metodo di correzione della crescita basata sulla massa

Un'alternativa al suddetto "Metodo di correzione della crescita mediante sottrazione della costante cinetica di crescita", che consente di evitare la necessità di correggere per la crescita, può essere utilizzata nel modo seguente. Si tratta fondamentalmente di utilizzare dati sulla depurazione in funzione della massa per pesce intero piuttosto che in funzione della concentrazione.

Convertire le concentrazioni riscontrate nei tessuti in fase di depurazione (massa della sostanza in esame/unità di massa del pesce) in massa della sostanza in esame/pesce: mettere in corrispondenza, sotto forma di tabella, le concentrazioni e il peso di ciascun pesce (ad esempio utilizzando un foglio di calcolo elettronico) e moltiplicando ciascuna concentrazione per il totale del peso del pesce in modo che la misura fornisca una serie di massa della sostanza in esame/pesce in tutte le sessioni di campionamento della fase di depurazione.

Tracciare il logaritmo naturale ottenuto con i dati della massa della sostanza chimica in funzione del tempo (fase di depurazione) come si farebbe normalmente.

Per il metodo di esposizione in ambiente acquatico, calcolare la costante cinetica di assorbimento come di consueto (cfr. sezioni 4 e 6; il valore k_2 "normale" è utilizzato nelle equazioni di interpolazione della curva di k_1) e detrarre la costante cinetica di depurazione da tali dati. Poiché il valore ottenuto per la costante cinetica di depurazione è indipendente dalla crescita, in quanto è stato ottenuto in base alla massa per pesce intero, va indicato come k_{2g} e non k_2 .

8. NORMALIZZAZIONE DEI LIPIDI AL 5 % DEL TENORE DI GRASSI (SOLO METODO DI ESPOSIZIONE IN AMBIENTE ACQUATICO)

I risultati del BCF (cinetico e allo stato stazionario) delle prove con esposizione in ambiente acquatico sono registrati anche in funzione del contenuto lipidico standard del 5 % del peso umido dei pesci, tranne quando si può provare che la sostanza in esame non si accumula nei grassi (ad esempio alcune sostanze perfluorurate possono legarsi alle proteine). Occorre convertire le concentrazioni nei pesci, o il BCF, in un tenore di lipidi del 5 % rispetto al peso umido. Se i pesci sono stati utilizzati per misurare le concentrazioni della sostanza e il contenuto lipidico in tutti i tempi di campionamento, è opportuno correggere le concentrazioni misurate individualmente in funzione del contenuto lipidico dei pesci.

$$C_{fL} = \frac{0,05}{L} \cdot C_f \quad \text{[equazione A5.29]}$$

Dove

C_{fL} = concentrazione normalizzata in relazione ai lipidi nel pesce (mg kg⁻¹ di peso umido)

L = frazione di lipidi (sulla base del peso umido)

C_f = concentrazione della sostanza in esame nel pesce (mg kg⁻¹ di peso umido)

Se non è stata eseguita un'analisi dei lipidi in tutti i pesci campionati, si utilizza un valore medio dei lipidi per normalizzare il BCF. Per quanto riguarda il fattore di bioconcentrazione (BCF) allo stato stazionario, occorre utilizzare il valore medio registrato alla fine della fase di assorbimento nel gruppo trattato. Per quanto concerne la normalizzazione del BCF cinetico vi possono essere casi in cui è giustificato un approccio diverso, ad esempio se il tenore di lipidi cambia notevolmente durante la fase di assorbimento e di depurazione. Tuttavia, si consiglia di prevedere un regime alimentare che consenta di ridurre al minimo qualunque cambiamento significativo del tenore di grassi.

$$BCF_{KL} = \frac{0,05}{L_n} \cdot BCF_K \quad \text{[equazione A5.30]}$$

Dove

BCF_{KL} = BCF cinetico normalizzato per il tenore lipidico (L kg⁻¹)

L_n = frazione di lipidi media (sulla base del peso umido)

BCF_K = fattore di bioconcentrazione cinetico (L kg⁻¹)

BIBLIOGRAFIA

- (1) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343–2355.
- (2) Capitolo C.20 del presente allegato, Prova di riproduzione con *Daphnia magna*.
- (3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1: 309-320.
- (4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined in vivo and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. *SAR QSAR Environ. Res.* 1: 29-39.

- (6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.
 - (7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1168-1177.
 - (8) OECD (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.
 - (9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. *T. Am. Fish. Soc.* 104: 785-792.
 - (10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*, Sheeman, P., *et al.*, Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.
 - (11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. *Can. J. Chem. Eng.* 55: 614-622.
 - (12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.
 - (13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. *Chemosphere.* 9: 3-19.
-

Appendice 6

EQUAZIONI PER LA PROVA DI ESPOSIZIONE IN AMBIENTE ACQUATICO: DISEGNO SPERIMENTALE DELLE PROVE RIDOTTE

I motivi che giustificano siffatta impostazione consistono nel fatto che il fattore di bioconcentrazione in una prova completa può essere determinato come fattore di bioconcentrazione allo stato stazionario (BCF_{SS}) calcolando il rapporto tra la concentrazione della sostanza in esame nei tessuti del pesce e la concentrazione della sostanza in esame nell'acqua, o calcolando il fattore di bioconcentrazione cinetico (BCF_k), come il rapporto tra la costante cinetica di assorbimento k_1 alla costante cinetica di depurazione k_2 . Il BCF_k è valido anche se una concentrazione allo stato stazionario di una sostanza chimica non è raggiunta durante l'assorbimento, a condizione che l'assorbimento e la depurazione agiscano approssimativamente secondo processi cinetici di primo ordine.

Se si misura la concentrazione della sostanza nei tessuti (C_{f1}) alla fine dell'esposizione (t_1) e si misura la concentrazione nei tessuti (C_{f2}) nuovamente dopo un certo tempo (t_2), si può stimare la costante cinetica di depurazione (k_2) con l'equazione A5.22 dell'appendice 5.

La costante cinetica di assorbimento, k_1 , può essere determinata in modo algebrico con l'equazione A5.23 dell'appendice 5 (dove C_f è pari a C_{f1} e t è pari a t_1) (1). Il fattore di bioconcentrazione cinetico per il disegno sperimentale della prova ridotta (designato come BCF_{km} per distinguerlo dai fattori di bioconcentrazione cinetica determinati con altri metodi) è:

$$BCF_{km} = \frac{k_1}{k_2} \quad \text{[equazione A6.1]}$$

È opportuno correggere le concentrazioni o i risultati dell'effetto di diluizione dovuto alla crescita e normalizzare rispetto a un contenuto di grassi nel pesce del 5 % (cfr. appendice 5).

Il BCF_{SS} minimizzato corrisponde al BCF calcolato alla fine della fase di assorbimento, supponendo che sia raggiunto lo stato stazionario. Ciò può essere solo presunto, in quanto il numero dei punti di campionamento non è sufficiente per dimostrarlo.

$$\text{minimised } BCF_{SS} = \frac{C_{f - \text{minSS}}}{C_{w - \text{minSS}}} \quad \text{[equazione A6.2]}$$

Dove

$C_{f - \text{minSS}}$ = concentrazione nel pesce allo stato stazionario assunto alla fine dell'assorbimento (mg kg^{-1} di peso umido).

$C_{w - \text{minSS}}$ = concentrazione in acqua allo stato stazionario presunto alla fine dell'assorbimento (mg kg^{-1}).

BIBLIOGRAFIA

- (1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

Appendice 7

EQUAZIONE PER LA PROVA CON ESPOSIZIONE PER VIA ALIMENTARE

1. Esempio di quantità di componenti di un adeguato mangime commerciale per pesci
2. Esempi di tecniche di addizionamento dell'alimento
3. Calcolo dell'efficienza di assimilazione e del fattore di biomagnificazione
4. Correzione dei lipidi
5. Valutazione delle differenze tra tempo misurato concentrazione zero ($C_{0, m}$) e derivati (tempo zero la concentrazione $C_{0, D}$)
6. Orientamenti per testare sostanze che si eliminano molto rapidamente

1. ESEMPIO DI QUANTITÀ DI COMPONENTI DI UN ADEGUATO MANGIME COMMERCIALE PER PESCI

Componenti principali	Mangime per pesci
Proteina grezza	≤ 55,0 %
Sostanze grasse grezze	≤ 15,0 % ⁽¹⁾
Fibra grezza	≥ 2,0 %
Umidità	≥ 12 %
Ceneri	≥ 8 %

⁽¹⁾ In alcune regioni, potrebbe essere possibile ottenere solo mangimi per pesce con un tenore lipidico molto inferiore a tale massimale. In tal caso, occorre effettuare la prova con il tenore di grassi inferiore nei mangimi e adeguare la razione alimentare in modo da mantenere i pesci in buona salute. È preferibile non aumentare artificialmente il tenore lipidico dei mangimi aggiungendo troppo di olio.

2. ESEMPI DI TECNICHE DI ADDIZIONAMENTO DELL'ALIMENTO

Aspetti generali

L'alimentazione per il gruppo di controllo è preparata esattamente allo stesso modo dei mangimi addizionati, ma senza l'aggiunta della sostanza in esame.

Per conoscere le concentrazioni nei mangimi trattati, occorre estrarre tre campioni di alimenti trattati con un idoneo un metodo di estrazione e misurare la radioattività e la concentrazione della sostanza in esame negli estratti. La possibilità di isolare la sostanza in esame (> 85 %) e la modesta variazione tra i campioni (tre concentrazioni della sostanza misurata su campioni prelevati all'inizio della prova non devono variare di oltre ± 15 % rispetto al valore medio) devono essere dimostrate.

Durante la prova con esposizione per via alimentare, è opportuno raccogliere tre campioni di alimenti al giorno 0 e alla fine della fase di assorbimento per determinare la concentrazione della sostanza in esame negli alimenti.

Preparazione di mangimi per pesci con un materiale sperimentale liquido (puro)

Stabilire una concentrazione nominale di prova nel regime alimentare dei pesci, ad esempio 500 µg di sostanza in esame/g di mangimi. La quantità appropriata (in funzione della massa molare o radioattività specifica) della sostanza in esame pura è addizionata ad una massa nota di un mangime per pesci in un barattolo di vetro o un evaporatore rotante. La massa di cibo deve essere sufficiente per tutta la durata della fase di assorbimento (tenere conto della necessità di aumentare le razioni a motivo della crescita dei pesci). I mangimi per pesci e la sostanza in esame vanno mescolati lentamente nel corso della notte (ad esempio mediante un miscelatore "rotorack" o, in caso di utilizzo di un evaporatore rotante, a rotazione). La dieta addizionata è conservata in condizioni che mantengano la stabilità della sostanza in esame all'interno della miscela (mediante refrigerazione) fino all'utilizzo.

Preparazione di mangimi per pesci con un disperdente (olio di pesce/mais)

Le sostanze solide devono essere triturate in polvere fine in un mortaio. Le sostanze liquide possono essere aggiunte direttamente all'olio di mais o di pesce. La sostanza sotto esame viene disciolta in una quantità nota di olio di mais o di pesce (per esempio da 5-15 ml). L'olio è trasferito quantitativamente trasferito mediante un evaporatore di tipo rotativo di dimensioni adatte. Il recipiente utilizzato per preparare i dosaggi di olio dovrebbe essere sciacquato con due piccole aliquote di olio e queste aggiunte all'evaporatore per assicurare che sia trasferita tutta la sostanza in esame disciolta. Per garantire la completa dissoluzione o dispersione nell'olio (o se più di una sostanza in esame viene utilizzata nello studio), è aggiunto un micro-miscelatore, il recipiente tappato e la miscela agitata rapidamente durante la notte. Una quantità adeguata di mangimi per pesci (solitamente sotto forma di pellet) per la prova è aggiunta all'evaporatore e i contenuti dello stesso vengono mescolati in modo omogeneo facendo ruotare continuamente l'evaporatore di vetro per almeno 30 minuti, ma preferibilmente durante la notte. In seguito, il mangime addizionato è conservato in modo appropriato (ad.es. refrigerato) per garantire la stabilità della sostanza in esame nel mangime fino all'utilizzo.

Preparazione di mangimi per pesci con un solvente organico

Una quantità adeguata della sostanza in esame (per massa molare o radioattività specifica) sufficiente per raggiungere l'obiettivo di dose è disciolta in un solvente organico idoneo (ad esempio, cicloesano o acetone; 10-40 ml, ma un maggiore volume se necessario in funzione della quantità di mangime da addizionare). Miscelare un'aliquota di questa soluzione o la sua totalità (riferita alla porzione addizionata) con un'adeguata massa di mangime per pesci, sufficiente perché la prova ottenga il necessario livello di dose nominale. Il mangime/sostanza in esame può essere miscelato in vasca in acciaio inossidabile e il mangime addizionato recentemente deve rimanere nella vasca in una cappa di laboratorio agitata per due giorni (occasionalmente) per consentire l'eccesso di solvente supplementare, oppure essere mescolato in un evaporatore rotante a bulbo con rotazione continua. L'eccesso di solvente può essere rimosso mediante un getto di aria o azoto, se necessario. Fare attenzione a che la sostanza in esame non cristallizzi man mano che il solvente viene rimosso. La dieta addizionata deve essere conservata in condizioni di refrigerazione (ad esempio) che mantengono la stabilità della sostanza in esame nel mix di mangime fino all'utilizzo.

3. CALCOLO DELL'EFFICIENZA DI ASSIMILAZIONE E DEL FATTORE DI BIOMAGNIFICAZIONE

Per calcolare l'efficienza di assimilazione occorre innanzitutto stimare la costante cinetica di depurazione globale come indicato nella sezione 4 dell'appendice 5 (con il metodo sequenziale, cioè con una regressione lineare standard) con concentrazioni medie misurate nei campioni della fase di depurazione. La costante della razione alimentare, I , e la durata di assorbimento, t , sono parametri noti dello studio. C_{food} , la concentrazione media misurata della sostanza in esame negli alimenti, è una variabile misurata nel corso dello studio. $C_{0,d}$ la concentrazione della sostanza in esame nel pesce alla fine della fase di assorbimento, è comunemente calcolata dall'intercetta della rappresentazione grafica del logaritmo naturale della concentrazione in funzione del giorno di depurazione.

L'efficienza di assimilazione della sostanza in esame (α , assorbimento della sostanza in esame nell'intestino) è calcolata come segue:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{food}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \quad [\text{equazione A7.1}]$$

Dove

C_0, D = concentrazione nel pesce ottenuta al giorno 0 della fase di depurazione (mg kg⁻¹);

k_2 = costante cinetica di depurazione (non corretta per la crescita) globale (giorno⁻¹), calcolato in base alle equazioni di cui all'appendice 5, sezione 3;

I = costante cinetica di ingestione (g di cibo g⁻¹ di pesce giorno⁻¹);

C_{food} = concentrazione nel cibo (mg kg⁻¹ di cibo);

t = durata del periodo di somministrazione (giorno)

Tuttavia può rendersi necessario adeguare alla crescita dei pesci la razione alimentare, I , utilizzato nei calcoli per ottenere un'efficienza di assimilazione (α) più precisa. In una prova in cui i pesci crescono in misura significativa durante la fase di assorbimento (durante la quale non si corregge la quantità di cibo per mantenere il tasso di somministrazione stabilito), il tasso effettivo di somministrazione alimentare man mano che la fase di assorbimento progredisce diventerà inferiore a quello stabilito, con un conseguente valore della "effettiva" efficienza di assimilazione superiore. (Questo aspetto non è rilevante per i calcoli complessivi del BMF, poiché i termini I si annullano tra le equazioni A7.1 e A7.4). Il tasso medio di somministrazione corretto dell'effetto di diluizione dovuto alla crescita, I_g , può essere ottenuto in vari modi, ma un metodo semplice e rigoroso consiste nell'utilizzare la costante cinetica di crescita (k_g) nota per stimare il peso dei pesci testati in determinati periodi della fase di assorbimento:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g t} \quad [\text{equazione A7.2}]$$

Dove

$W_f(t)$ = peso medio dei pesci al giorno t della fase di assorbimento

$W_{f,0}$ = media del peso dei pesci all'inizio dell'esperimento

In questo modo (almeno), si può stimare il peso medio dei pesci nell'ultimo giorno di esposizione ($W_{f,\text{end-of-uptake}}$). Poiché il tasso di somministrazione alimentare è stato stabilito in base a $W_{f,0}$, l'effettivo tasso per ogni giorno di assorbimento può essere calcolato utilizzando i valori relativi al peso. Il tasso di somministrazione alimentare corretto per la crescita, I_g (g di cibo g⁻¹ di pesce giorno⁻¹), da utilizzare in sostituzione di I in caso di rapida crescita durante la fase di assorbimento, può essere calcolata come

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,\text{end-of-uptake}}} \quad [\text{equazione A7.3}]$$

Una volta ottenuta l'efficienza di assimilazione, si può calcolare il BMF moltiplicandolo per la costante del tasso di alimentazione I (o I_g , se quest'ultimo è stato utilizzato per calcolare α) e dividendo il prodotto per la costante cinetica di depurazione globale k_2 :

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_2} \quad [\text{equazione A7.4}]$$

Il fattore di biomagnificazione corretto per la crescita è calcolato secondo le stesse modalità, impiegando la costante cinetica di depurazione corretta per la crescita (ottenuta come indicato nella sezione 7 dell'appendice 5). Ancora una volta, se I_g è servito a calcolare α , è opportuno utilizzarlo anche qui invece di I :

$$BMF = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \quad [\text{equazione A7.5}]$$

dove:

α = efficienza di assimilazione (assorbimento della sostanza in esame per via intestinale).

k_2 = costante cinetica di depurazione (non corretta per la crescita) globale (giorno-1), calcolata con le equazioni di cui all'appendice 5, sezione 3;

k_{2g} = costante cinetica di depurazione corretta per la crescita (giorno-1);

I = costante cinetica di ingestione (g di cibo g-1 di pesce giorno-1);

Il tempo di dimezzamento corretto per la crescita ($t_{1/2}$) è calcolato come segue:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_{2g}} \quad \text{[equazione A7.6]}$$

È possibile stimare anche l'efficienza di assimilazione della sostanza chimica con il cibo se sono determinati residui nei tessuti durante la fase lineare della fase di assorbimento (tra i giorni 1 e 3). In questo caso occorre analizzare l'efficienza di assimilazione della sostanza (α) come segue:

$$\alpha = \frac{C_{fish}(t)}{I \times C_{food} \times t} \quad \text{[equazione A7.7]}$$

Dove

$C_{fish}(t)$ = concentrazione della sostanza in esame nel pesce di prova al tempo t (mg kg-1 di peso umido).

4. CORREZIONE DEL TENORE DI GRASSI

Se il tenore di lipidi è stato misurato negli stessi pesci sottoposti all'analisi chimica in tutti i tempi di campionamento, si consiglia di correggere le concentrazioni individuali in funzione dei lipidi e di tracciare il logaritmo naturale della concentrazione, corretto per il tenore di grassi in funzione della depurazione (giorno) per ottenere $C_{0,d}$ e k_2 . L'efficienza di assimilazione (equazione A7.1) può essere calcolata sulla base dei lipidi utilizzando C_{food} sulla base dei lipidi (cioè C_{food} è moltiplicato per la frazione media di grassi negli alimenti). Calcoli successivi con le equazioni A7.4 e A7.5 daranno il BMF corretto per il tenore lipidico (e dell'effetto di diluizione dovuto alla crescita) direttamente.

In caso contrario, le frazioni medie di grassi (peso umido) nel pesce e nei mangimi sono ottenute per entrambi i gruppi, di controllo e di prova (per quanto riguarda il cibo e i pesci del gruppo di controllo, ciò si ottiene generalmente dai dati misurati all'inizio e alla fine dell'esposizione; per il gruppo di trattamento, si ottiene generalmente dai dati misurati solo alla fine dell'esposizione). In alcuni studi, il contenuto lipidico dei pesci può aumentare sensibilmente; in tal caso è preferibile utilizzare una concentrazione media dei lipidi nel pesce testato calcolata sulla base dei valori misurati alla fine dell'esposizione e alla fine della depurazione. In generale, i dati dal solo gruppo di prova dovrebbero essere utilizzati per ottenere entrambe le frazioni di grassi.

Il fattore di correzione del tenore di grassi (L_c) è calcolato come segue:

$$L_c = \frac{L_{fish}}{L_{food}} \quad \text{[equazione A7.8]}$$

In cui L_{fish} and L_{food} sono le frazioni medie di grassi rispettivamente nel pesce e nei mangimi.

Il fattore di correzione del tenore di grassi è usato per il calcolo del fattore di biomagnificazione corretto per il tenore lipidico (BMFL):

$$BMF_L = \frac{BMF}{L_c} \quad \text{[equazione A7.9]}$$

5. VALUTAZIONE DELLE DIFFERENZE TRA LA CONCENTRAZIONE MISURATA AL TEMPO 0 ($C_{0,M}$) E LA CONCENTRAZIONE CALCOLATA PER IL TEMPO 0 ($C_{0,D}$)

Occorre confrontare la concentrazione misurata al tempo 0 ($C_{0,m}$) e la concentrazione calcolata per il tempo 0 ($C_{0,d}$). Se sono molto simili, si può ritenere adeguato il modello di primo ordine utilizzato per ottenere i parametri di depurazione.

In alcuni studi, si osserverà una differenza sostanziale tra il valore ottenuto per il tempo 0, $C_{0,d}$, e la concentrazione media misurata al tempo 0, $C_{0,m}$ (cfr. ultimo trattino del paragrafo 159). Se $C_{0,d}$ è nettamente inferiore a $C_{0,m}$ ($C_{0,d} \ll C_{0,m}$), tale differenza può indicare la presenza, nell'intestino dei pesci, di mangimi addizionati non digeriti. Per averne la prova, si possono analizzare separatamente gli intestini escissi se, alla fine della fase di assorbimento, sono stati prelevati e conservati esemplari supplementari di pesce. In caso contrario, qualora risulti da un test di outlier statisticamente valido applicato alla regressione lineare della fase di depurazione che il primo punto di campionamento della fase di depurazione è erroneamente elevato, può essere utile proseguire la regressione lineare per ottenere k_2 , ma omettendo la concentrazione al primo tempo della depurazione. In tal caso, se l'incertezza nella regressione lineare appare fortemente diminuita e appare evidente che il processo di depurazione abbia seguito approssimativamente una cinetica di primo ordine, si possono utilizzare i valori $C_{0,d}$ e k_2 ottenuti con il calcolo dell'efficienza di assimilazione. Ciò deve essere debitamente giustificato nella relazione di prova. È inoltre possibile che la fase di depurazione non abbia seguito una cinetica di primo ordine. Se tale ipotesi è probabile (cioè i dati trasformati con logaritmo naturale sembrano seguire una curva rispetto alla retta di regressione lineare), è poco probabile che i calcoli di k_2 e $C_{0,d}$ siano validi, e si raccomanda di ricorrere al consiglio di un esperto in biostatistica.

Se $C_{0,d}$ è nettamente superiore al valore misurato ($C_{0,d} > C_{0,d,m}$) ciò potrebbe significare: che la sostanza è stata eliminata in tempi rapidi (il tempo di campionamento si avvicina al limite di quantificazione del metodo analitico molto all'inizio della fase di depurazione, cfr. la sezione 6); che il processo di depurazione non segue una cinetica di primo ordine; che la regressione lineare per ottenere k_2 e $C_{0,d}$ è errata; o che si è verificato un problema con le concentrazioni misurate nel corso dello studio in alcuni punti di campionamento. È quindi necessario esaminare il tracciato della regressione lineare per identificare i campioni al limite o in prossimità del limite di quantificazione, i valori anomali e una curva manifesta (che suggerirebbe che la depurazione non ha seguito una cinetica di primo ordine) e evidenziarne chiaramente i risultati nella relazione di prova. Ogni successiva rivalutazione della regressione lineare per migliorare le stime dovrà essere descritta e giustificata. Se si registra una deviazione significativa della cinetica di primo ordine, è poco probabile che i calcoli di k_2 e $C_{0,d}$ siano validi, e si raccomanda di ricorrere al consiglio di un esperto in biostatistica.

6. ORIENTAMENTI PER TESTARE SOSTANZE CHE SONO ELIMINATE MOLTO RAPIDAMENTE

Come indicato al paragrafo 129, alcune sostanze possono avere un'eliminazione talmente rapida da non poter ricavare una concentrazione affidabile al tempo 0, $C_{0,d}$ né k_2 perché la sostanza non è più effettivamente misurata (concentrazioni sono al limite della quantificazione) già molto presto nel corso della fase di depurazione (a partire dal secondo campionamento). Tale situazione, rilevata in occasione della prova interlaboratori eseguita con il benzo [a] pirene, è stata riportata nella relazione di validazione del presente metodo di prova. In questo caso non è possibile proseguire la regressione lineare in modo attendibile, in quanto risulterebbe probabilmente una stima eccessivamente elevata di $C_{0,d}$, con un'efficienza di assimilazione che apparirebbe nettamente superiore a 1. In tal caso, si può procedere a una stima prudente di k_2 e si può calcolare un "limite superiore" di BMF.

Utilizzando i dati dei tempi della fase di depurazione in cui è stata misurata la concentrazione, fino alla prima concentrazione non rilevata (ivi compresa) (concentrazione al limite della quantificazione) una regressione lineare (basata sulle concentrazioni trasformate in logaritmi naturali in funzione del tempo) fornirà una stima di k_2 . Ciò richiederà spesso solo due tempi di misurazione (ad esempio i giorni di campionamento 1 e 2 della fase di depurazione) e k_2 potrà poi essere stimato con l'equazione A5.22 presentata nell'appendice 5. Tale stima di k_2 può servire a calcolare l'efficienza di assimilazione con l'equazione A7.1, sostituendo al valore $C_{0,d}$ nella formula la concentrazione misurata al tempo 0 ($C_{0,m}$) qualora la stima di $C_{0,d}$ sia nettamente superiore a quanto il test avrebbe consentito di ottenere. Se $C_{0,m}$ non era misurabile, utilizzare il limite di rilevamento analitico nei tessuti dei pesci. Se, in alcuni casi, ciò dà un valore $\alpha > 1$ allora si presume che l'efficienza di assimilazione pari a 1 rappresenti il "caso peggiore".

Il valore massimo di BMF_k può essere stimato con l'equazione A7.4 e dovrà essere indicato come un valore "molto inferiore a" (\ll). Ad esempio, uno studio condotto con un tasso di alimentazione del 3 % e un tempo di dimezzamento di depurazione inferiore a 3 giorni, e il "caso peggiore" di $\alpha = 1$, il BMF_k rischia di essere inferiore a circa 0,13. Dato lo scopo di questa stima e il fatto che i valori avranno carattere prudenziale, non è necessario correggerli degli effetti di diluizione dovuto alla crescita e per il contenuto di lipidi nel pesce o nel cibo.

Appendice 8

METODI PER STIMARE I BCF PROVVISORI SULLA BASE DEI DATI RACCOLTI NELLO STUDIO CON ESPOSIZIONE PER VIA ALIMENTARE

Il metodo di esposizione per via alimentare è presentato nel presente metodo di prova per testare il bioaccumulo delle sostanze che non possono essere testate con il metodo di esposizione attraverso l'ambiente acquatico. Il metodo di esposizione attraverso l'ambiente acquatico dà un fattore di bioconcentrazione, mentre quello per via alimentare fornisce direttamente informazioni sul potenziale di biomagnificazione degli alimenti. In diversi regimi di sicurezza dei prodotti chimici sono necessarie informazioni sulla bioconcentrazione acquatica (ad esempio per la valutazione dei rischi o il sistema mondiale armonizzato di classificazione). È pertanto necessario utilizzare i dati ottenuti da uno studio di esposizione per via alimentare per calcolare un fattore di bioconcentrazione comparabile alle prove effettuate secondo il metodo di esposizione attraverso l'ambiente acquatico ⁽¹⁾. Questa sezione esamina diversi approcci in tal senso, pur riconoscendo i limiti intrinseci a tali stime.

Lo studio per via alimentare misura la depurazione per ottenere la costante cinetica di depurazione, k_2 . Se si può stimare la costante cinetica di assorbimento con i dati disponibili per la situazione in cui il pesce è stato esposto alla sostanza in esame attraverso l'ambiente acquatico, si potrà calcolare un BCF cinetico.

La stima di una costante cinetica di assorbimento per l'esposizione attraverso l'ambiente acquatico alla sostanza in esame si basa su numerose ipotesi, che contribuiscono tutte all'incertezza dei risultati. Inoltre, tale questo approccio per stimare un BCF presuppone che la velocità complessiva di depurazione (compresi i fattori rilevanti, quali la ripartizione nel corpo e i processi di depurazione individuali) sia indipendente dalla tecnica di esposizione utilizzata per produrre un carico corporeo della sostanza in esame.

Le principali ipotesi inerenti a tale approccio di stima possono essere riassunte come segue:

La depurazione a seguito di assunzione alimentare è la stessa della depurazione a seguito di esposizione attraverso l'ambiente acquatico a una determinata sostanza;

L'assorbimento attraverso l'ambiente acquatico segue una cinetica di primo ordine;

A seconda del metodo utilizzato per stimare l'assorbimento:

- l'assorbimento può essere correlato al solo peso del pesce;
- l'assorbimento può essere correlato al solo coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua della sostanza;
- l'assorbimento può essere correlato a una combinazione del peso del pesce e del coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua della sostanza;
- i fattori che in pratica possono influenzare l'assorbimento in una prova con esposizione in ambiente acquatico, quali la biodisponibilità della sostanza, l'adsorbimento verso l'apparecchiatura, la dimensione molecolare ecc., hanno un impatto limitato
- e, soprattutto:

La banca dati utilizzata per sviluppare il metodo di stima dell'assorbimento è rappresentativa della sostanza in esame.

Numerose pubblicazioni in letteratura riportano le equazioni che mettono in correlazione l'assorbimento di acqua nei pesci attraverso le branchie e il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua di una sostanza, il peso del pesce (1) (2) (3) (4), il volume e/o il contenuto lipidico, la permeabilità/diffusione delle membrane (5) (6), il volume di ventilazione dei pesci (7) e mediante un approccio fugacità/ bilancio di massa (8) (9) (10). Una valutazione dettagliata di tali approcci in questo contesto figura in Crookes & Brooke (11). Una pubblicazione di Barber (12), che si è adoperato per modellizzare il bioaccumulo associato all'assunzione alimentare, si rivela utile in questo contesto, poiché comprende i contributi di modelli di cinetica di assorbimento attraverso le branchie. Anche una sezione del documento di riferimento sul protocollo alimentare del 2004 (13) è dedicata a questo aspetto.

⁽¹⁾ In natura, il meccanismo che porta alla maggiore esposizione in ambiente acquatico è probabilmente l'ingestione di sostanze estremamente idrofobe; pertanto, un BCF stimato non è necessariamente rappresentativo del potenziale di bioaccumulo di tali sostanze.

Per la maggior parte, tali modelli sembrano elaborati a partire da banche dati limitate. Per quanto riguarda i modelli per i quali sono disponibili informazioni dettagliate sulle banche dati utilizzate per la loro elaborazione, sembra che i tipi di sostanze utilizzate presentino spesso una struttura simile o rientrino nella stessa classe (in termini di funzionalità, ad esempio i composti organoclorurati). Ciò aumenta l'incertezza di utilizzare un modello al fine di prevedere la costante cinetica di assorbimento per un tipo di sostanza diverso, in aggiunta a considerazioni specifiche alla prova quali le specie sperimentali, la temperatura, ecc.

Una panoramica delle tecniche disponibili (11) mostra che nessuna metodologia è "più corretta" delle altre. Occorre pertanto giustificare chiaramente la scelta del modello utilizzato. Quando sono disponibili diversi metodi la cui applicazione può essere giustificata, è prudente presentare più di una stima di k_1 (e quindi del BCF) o un intervallo di valori di k_1 (e del BCF) secondo i diversi possibili metodi di stima dell'assorbimento. Tuttavia, date le differenze tra i tipi di modello e le banche dati utilizzate per svilupparli, non sarebbe opportuno adottare una media delle stime ottenute con questi diversi metodi.

Alcuni ricercatori ipotizzano che tali stime del fattore di bioconcentrazione (BCF) richiedano una correzione della biodisponibilità per tener conto dell'adsorbimento della sostanza rispetto al carbonio organico disciolto (DOC) in un ambiente acquatico, affinché la stima corrisponda ai risultati degli studi di esposizione in ambiente acquatico [ad esempio (13) (14)]. Tale correzione non è però necessariamente adeguata a causa dei bassi livelli di COD richiesti in uno studio con esposizione in ambiente acquatico per una stima nel "caso peggiore" (ossia il rapporto tra la sostanza biodisponibile e la sostanza misurata in soluzione). Con le sostanze estremamente idrofobe, l'assorbimento attraverso le branchie può essere limitato dal tasso di diffusione passivo in prossimità della superficie delle branchie; in tal caso, è possibile che la correzione tenga conto di questo effetto e non di quello che si voleva correggere.

È consigliabile concentrarsi sui metodi che richiedono dati di base facilmente disponibili sulle sostanze esaminate con il metodo di esposizione per via alimentare qui descritto (vale a dire il log K_o/w , e il peso dei pesci). Altri metodi che richiedono dati di base più complessi sono applicabili, ma potrebbero richiedere ulteriori misurazioni nel corso della prova o una conoscenza approfondita della sostanza in esame o sulle specie sperimentali che potrebbero essere difficili da ottenere. Inoltre, la scelta del modello può essere influenzata dal livello di validazione e dal campo di applicabilità (cfr. (11) per una panoramica e un raffronto dei diversi metodi).

Occorre tenere presente che la risultante stima di k_1 o il BCF stimato, sono valori incerti e potrebbero richiedere l'applicazione del "peso dell'evidenza" assieme al BMF ottenuto e ai parametri relativi alla sostanza (ad es. dimensione molecolare) per avere una visione d'insieme del potenziale di bioaccumulo di una sostanza. L'interpretazione e l'uso di tali parametri possono variare in funzione del quadro normativo.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 25: 1-14.
- (2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. *Aquat. Toxicol.* 30: 325-341.
- (3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined in vivo and in isolated perfused gills. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 131: 130-135.
- (4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 1963-1992.
- (5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in *Aquatic Toxicology and Environmental Fate*, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.

- (6) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2343-2355.
- (7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. *Environ. Sci. Technol.* 23: 699-707.
- (8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 1399-1420.
- (9) Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. *Environ. Sci. Technol.* 31: 577-583.
- (10) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. *QSAR Comb. Sci.* 22: 337-345.
- (11) Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.
- (12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 27: 755-777
- (13) Anonymous (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.
- (14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in *Handbook of property estimation methods for chemicals*, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA: 189-231.»