

C.50 Prova di tossicità su *Myriophyllum spicatum* in un sistema di prova senza sedimento

INTRODUZIONE

1. Il presente metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 238 (2014) ed è inteso a valutare la tossicità delle sostanze chimiche su *Myriophyllum spicatum*, una specie di piante acquatiche sommerse della classe delle dicotiledoni, del genere delle millefoglie d'acqua. Il metodo si basa su un metodo di prova dell'ASTM (1), modificato per essere basato su un sistema di prova senza sedimento (2) al fine di valutare l'ecotossicità intrinseca delle sostanze chimiche in esame (indipendentemente dal modo in cui tali sostanze chimiche in esame si distribuiscono tra acqua e sedimento). Un sistema di prova senza sedimento presenta una modesta complessità analitica (solamente nella fase acquosa) e i risultati possono essere analizzati in parallelo e/o confrontandoli con quelli ottenuti nella prova su *Lemna sp.* (3). Le condizioni che impongono un ambiente sterile consentono inoltre di limitare al minimo gli effetti di microrganismi e alghe (assorbimento chimico/degradamento, ecc.). La presente prova non sostituisce altre prove di tossicità acquatica, ma è volta piuttosto a integrarle per consentire una maggiore completezza della valutazione del pericolo e dei rischi per la flora acquatica. Il metodo di prova qui proposto è stato validato da una prova interlaboratorio (4).
2. Sono descritte dettagliatamente le procedure con rinnovo (procedura semistatica) e senza rinnovo (procedura statica) della soluzione di prova. In funzione degli obiettivi della prova e delle prescrizioni normative si raccomanda l'uso di metodi semistatici, ad esempio per le sostanze che spariscono rapidamente dalla soluzione per volatilizzazione, assorbimento, fotodegradazione, idrolisi, precipitazione o biodegradazione. Ulteriori orientamenti sono contenuti nel riferimento (5). Il presente metodo di prova si applica alle sostanze, per le quali il metodo è stato validato (per maggiori dettagli si rimanda alla relazione sulla prova interlaboratorio (4)), o alle formulazioni o a miscele conosciute. Nelle prove relative a miscele è opportuno individuarne e quantificarne il più possibile i costituenti. Il metodo di prova su *Myriophyllum spicatum* in un sistema di prova senza sedimento è complementare rispetto alla prova di tossicità su *Myriophyllum spicatum* in un sistema di prova acqua-sedimento (6). Prima dell'uso del metodo di prova su una miscela, per la generazione di dati per un determinato scopo normativo, occorre esaminare se, e in caso affermativo perché, può fornire risultati adeguati a tale scopo. Tali considerazioni non sono necessarie in presenza di un obbligo normativo di prova sulla miscela.

PRINCIPIO DELLA PROVA

3. Le colture di *Myriophyllum spicatum* a crescita costante (unicamente in un mezzo di prova di Andrews modificato, cfr. appendice 2) sono messe in condizione di crescere come monoculture a diverse concentrazioni della sostanza chimica in esame per un periodo di 14 giorni nel quadro di un sistema di prova senza sedimento. L'obiettivo della prova è quantificare gli effetti della sostanza chimica sulla crescita vegetativa nel corso di questo periodo, sulla base della valutazione di determinate variabili di misurazione. Tali variabili sono la crescita della lunghezza dei germogli, dei rami laterali e delle radici nonché l'evoluzione del peso fresco e secco e l'aumento del numero di verticilli. La prova tiene inoltre conto delle modifiche qualitative specifiche negli organismi di prova, come malformazioni o clorosi e necrosi indicate da un ingiallimento o da una colorazione bianca o marrone. Per quantificare gli effetti della sostanza chimica, si confronta la crescita nelle soluzioni di prova con quella nei controlli e si determina la concentrazione che causa una data percentuale di inibizione della crescita, espressa come EC_x , dove "x" può corrispondere a qualsiasi valore prescritto dal quadro regolamentare, ad es. EC_{10} , EC_{20} , EC_{50} . Va notato che le stime dei valori di EC_{10} ed EC_{20} sono affidabili e idonee solo nelle prove in cui i coefficienti di variazione per le piante di controllo sono inferiori al livello di effetto stimato, pertanto per un valore EC_{20} i coefficienti di variazione dovrebbero rimanere al di sotto del 20 %.
4. È opportuno determinare il tasso di crescita specifico medio (stimato in base alla lunghezza del germoglio principale e alla misurazione di tre ulteriori variabili) e il rendimento (stimato in base alla crescita della lunghezza del germoglio principale e alla misurazione di tre ulteriori variabili) delle piante trattate e non trattate. Di conseguenza il tasso di crescita specifico (r — *rate*) e il rendimento (y — *yield*) sono usati per determinare, rispettivamente, il valore $E_r C_x$ (ad es. $E_r C_{10}$, $E_r C_{20}$, $E_r C_{50}$) e il valore $E_y C_x$ (ad es. $E_y C_{10}$, $E_y C_{20}$, $E_y C_{50}$).
5. Inoltre la concentrazione minima a cui si osserva un effetto statisticamente significativo (LOEC) e la concentrazione senza effetti osservabili (NOEC) possono essere determinate mediante un calcolo statistico.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA CHIMICA IN ESAME

6. Occorre disporre di un metodo analitico con un'adeguata sensibilità per la quantificazione della sostanza chimica nel mezzo di prova. Le informazioni sulla sostanza chimica in esame che possono essere utili per stabilire le condizioni sperimentali comprendono la formula strutturale, la purezza e le impurità, l'idrosolubilità, la stabilità in acqua e alla luce, la costante di dissociazione acida (pK_a), il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (K_{ow}), la pressione di vapore e la biodegradabilità. L'idrosolubilità e la pressione di vapore possono essere utilizzate per calcolare la costante di Henry, che indica se possono verificarsi perdite significative della sostanza chimica in esame nel corso della prova. Il calcolo consente di stabilire se occorre adottare misure specifiche per tenere sotto controllo tali perdite. Quando la solubilità e la stabilità della sostanza chimica in esame non sono conosciute con certezza, si consiglia di verificarle nelle condizioni sperimentali, ossia nel mezzo di crescita, alla temperatura e con l'illuminazione che si utilizzeranno nella prova.
7. È particolarmente importante regolare il pH del mezzo di prova, ad es. quando si saggiano metalli o sostanze chimiche idroliticamente instabili. Un documento di orientamento OCSE (5) fornisce ulteriori orientamenti per saggiare sostanze chimiche le cui proprietà fisico-chimiche rendono difficile la conduzione delle prove.

VALIDITÀ DELLA PROVA

8. Affinché la prova sia considerata valida, è necessario che la lunghezza del germoglio principale nel controllo sia almeno raddoppiata in meno di 14 giorni. Utilizzando il mezzo e le condizioni di prova descritti nel metodo di prova, questo criterio può essere soddisfatto utilizzando una procedura sperimentale statica o semistatica.
9. Nelle colture di controllo, il coefficiente di variazione medio del rendimento basato sulle misurazioni del peso fresco del germoglio (ossia tra l'inizio e la fine della prova) e le altre variabili di misurazione (cfr. paragrafo 37) non deve superare il 35 % tra le repliche.
10. Oltre il 50 % delle repliche del gruppo di controllo devono restare sterili nel corso del periodo di esposizione di 14 giorni, ossia non devono essere osservabili contaminazioni da parte di altri organismi come alghe, funghi e batteri (la soluzione deve essere limpida). *Nota:* La relazione sulla prova interlaboratorio (4) fornisce indicazioni sulle modalità di valutazione della sterilità.

SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

11. La procedura sperimentale può essere verificata saggiando sostanze chimiche di riferimento, come per esempio il 3,5-diclorofenolo utilizzato nella prova interlaboratorio (4). Sulla base dei risultati della prova interlaboratorio, i valori medi di EC_{50} del 3,5-diclorofenolo per le diverse variabili di risposta (cfr. paragrafi 37-42 del presente metodo di prova) sono compresi tra 3,2 mg/l e 6,9 mg/l (per i dettagli sull'intervallo di confidenza per tali valori si rimanda alla relazione sulla prova interlaboratorio). Si consiglia di effettuare una prova con una sostanza chimica di riferimento almeno due volte l'anno o, qualora la prova sia realizzata con una frequenza inferiore, parallelamente alla determinazione della tossicità della sostanza chimica in esame.

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiature

12. Tutte le apparecchiature che entrano in contatto con i mezzi di prova devono essere di vetro o di un altro materiale chimicamente inerte. Le apparecchiature di vetro utilizzate per le colture e le prove devono essere esenti da contaminanti chimici che potrebbero penetrare nel mezzo di prova e devono essere sterili. I recipienti di prova devono essere abbastanza alti da consentire al germoglio nei recipienti di controllo di crescere nella fase acquatica senza raggiungere la superficie del mezzo di prova a fine prova. Si consiglia di utilizzare dei tubi di prova in vetro al borosilicato con pareti spesse e bordi lisci, con un diametro interno di circa 20 mm e un'altezza di circa 250 mm, con tappi in alluminio.
13. Visto che il mezzo di prova di Andrews modificato contiene saccarosio (che stimola la crescita di funghi e batteri), le soluzioni di prova vanno preparate in condizioni sterili. Tutti i liquidi e tutta l'attrezzatura sono sterilizzati prima dell'uso. La sterilizzazione avviene tramite un trattamento termico ad aria calda (210°C) dalla durata di 4 ore o in autoclave per 20 minuti a 121°C. Inoltre, tutti i matracci, le piastre, le ciotole, ecc. e le altre attrezzature sono sottoposti a trattamento a fiamma su un piano di lavoro sterilizzato immediatamente prima dell'uso.

14. Le colture e i recipienti di prova non devono essere tenuti insieme; è quindi opportuno utilizzare camere di crescita ambientali, incubatori o locali separati. L'illuminazione e la temperatura devono essere regolabili e mantenute ad un livello costante.

Organismo sperimentale

15. Il *Myriophyllum spicatum* è una specie di piante acquatiche sommerse della classe delle dicotiledoni, del genere delle millefoglie d'acqua. Tra giugno e agosto produce fiori non molto appariscenti di color rosa-bianco che emergono sulla superficie dell'acqua. Le radici delle piante sono ancorate al suolo con un sistema di rizomi robusti. Queste piante crescono nell'intero emisfero boreale in acque stagnanti eutrofiche ma non inquinate e con un tenore di calcio piuttosto elevato, con un substrato fangoso. Il *Myriophyllum spicatum* predilige l'acqua dolce, ma cresce anche in acque salmastre.
16. Per la prova di tossicità in un sistema di prova senza sedimento è necessario usare piante sterili. Se il laboratorio di prova non dispone già di colture di *Myriophyllum spicatum*, può reperire il materiale vegetale sterile presso un altro laboratorio, può prelevarne degli esemplari (non sterili) in natura oppure ancora procurarseli sul mercato. Se tali piante sono prelevate in natura, è necessario procedere a una verifica tassonomica della specie. Nel caso di reperimento in natura o di acquisizione sul mercato, le piante devono essere sterilizzate (1) e tenute nello stesso mezzo che sarà utilizzato per le prove per almeno otto settimane prima dell'utilizzo. Le colture di partenza reperite in natura possono essere prelevate solo in siti chiaramente esenti da fonti evidenti di inquinamento. In occasione dei prelievi in natura, è necessario procedere con la massima cura per scegliere la specie desiderata, in particolare nelle regioni in cui sussiste il rischio di formazione di ibridi con altre specie di *Myriophyllum*. Se le colture provengono da un altro laboratorio, devono essere tenute in condizioni analoghe per almeno tre settimane. La fonte del materiale vegetale e la specie utilizzata per la prova devono sempre essere indicate.
17. La qualità e l'uniformità delle piante utilizzate per la prova avranno un impatto significativo sui risultati della stessa e le piante dovrebbero pertanto essere selezionate con cura. Occorre utilizzare piante giovani, in rapida crescita, prive di lesioni visibili e di parti scolorite (clorosi). Una descrizione generale dell'organismo di prova è contenuta nell'appendice 4.

Culture

18. Per ridurre la frequenza degli interventi per il mantenimento delle colture (ad esempio, se per un certo periodo, non si prevedono prove su *Myriophyllum*), le colture possono essere conservate ad un'illuminazione e una temperatura ridotte ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). Informazioni dettagliate sulla coltura sono riportate nell'appendice 3.
19. Almeno in un periodo compreso tra i 14 e i 21 giorni prima della prova, un numero sufficiente di organismi di prova è trasferito in modo asettico in un nuovo mezzo sterile e coltivato per un periodo da 14 a 21 giorni nelle condizioni previste per la prova, a titolo di pre-coltura. Informazioni dettagliate sulla preparazione di una pre-coltura sono riportate nell'appendice 4.

Mezzo di prova

20. Si raccomanda l'uso di un solo mezzo nutritivo per il *Myriophyllum spicatum* in un sistema di prova senza sedimento, come descritto nell'appendice 2. Si raccomanda di modificare il mezzo di prova di Andrews per la coltura del *Myriophyllum spicatum* e per le prove su tale specie, conformemente alle indicazioni di cui al riferimento (1). Il mezzo di prova di Andrews modificato è ottenuto utilizzando cinque soluzioni madre con l'aggiunta di saccarosio (3 %). Informazioni dettagliate sulla preparazione del mezzo sono riportate nell'appendice 2.
21. Per ottenere le soluzioni di prova (se opportuno, con diluizione) è necessario un mezzo di prova di Andrews modificato con una concentrazione decuplicata. La composizione di questo mezzo è riportata all'appendice 2.

Soluzioni di prova

22. Le soluzioni di prova sono generalmente preparate mediante diluizione di una soluzione madre. Le soluzioni madre della sostanza chimica in esame sono solitamente preparate sciogliendo la sostanza chimica in acqua demineralizzata (ossia distillata o deionizzata). Il mezzo di prova di Andrews modificato con concentrazione decuplicata consente di aggiungere nutrienti.

23. Le soluzioni madre della sostanza chimica in esame possono essere sterilizzate in autoclave a 121 °C per 20 minuti o con sterilizzazione mediante filtrazione, a condizione che la tecnica di sterilizzazione impiegata non modifichi la natura della sostanza chimica in esame. Le soluzioni di prova possono anche essere preparate in acqua demineralizzata o in un mezzo demineralizzato, in condizioni sterili. Nella scelta della procedura di sterilizzazione delle soluzioni madre della sostanza chimica in esame si dovrà tenere conto della termostabilità e dell'assorbimento su diverse superfici. Per questo motivo si raccomanda che le soluzioni madre siano preparate in condizioni sterili, ossia usando materiali sterili per dissolvere in acqua sterile la sostanza chimica in esame in condizioni sterili (ad es. tramite flambaggio o cappa a flusso laminare). Questa tecnica di preparazione delle soluzioni madre sterili si applica sia alle sostanze, sia alle miscele.
24. La concentrazione più elevata della sostanza chimica in esame non deve di norma superarne il limite di solubilità in acqua, nelle condizioni di prova. Per le sostanze chimiche a bassa idrosolubilità potrà essere necessario preparare una soluzione madre concentrata o disperdere la sostanza chimica utilizzando un solvente o un disperdente organico, al fine di agevolare l'aggiunta di quantità esatte della sostanza chimica in esame nel mezzo di prova e favorirne la dispersione e la dissoluzione. Occorre fare il possibile per evitare di utilizzare tali materiali. Non si deve verificare una fitotossicità dovuta a solventi o disperdenti. Tra i solventi di uso comune che non provocano fitotossicità a concentrazioni fino a 100 µl/l rientrano, ad esempio, l'acetone e il dimetilformammide. Se si utilizza un solvente o un disperdente, la sua concentrazione finale deve essere comunicata e tenuta al minimo (ossia $\leq 100 \mu\text{l/l}$); deve inoltre essere identica in tutti i recipienti trattati e di controllo. Ulteriori informazioni sull'uso dei disperdenti sono riportate al riferimento (5).

Gruppi sperimentali e gruppi di controllo

25. Per determinare le concentrazioni sperimentali adeguate è utile conoscere già la tossicità della sostanza chimica in esame nei confronti del *Myriophyllum spicatum*, per esempio sulla base di precedenti prove a diversi intervalli di concentrazione. La prova di tossicità definitiva dovrebbe di norma prevedere da cinque (analogamente alla prova di inibizione della crescita di specie *Lemna*, trattata nel capitolo C.26 del presente allegato) a sette concentrazioni di prova che formino una serie geometrica. Le concentrazioni dovrebbero essere scelte facendo sì che i valori NOEC e EC_{50} siano compresi nell'intervallo delle concentrazioni di prova (cfr. infra). Di preferenza il fattore di separazione tra le concentrazioni non deve essere superiore a 3,2, ma si può utilizzare un valore più elevato se la curva concentrazione-risposta è piatta. L'uso di un numero di concentrazioni inferiore a cinque va giustificato. Occorre realizzare almeno cinque repliche per ogni concentrazione.
26. Nel fissare l'intervallo delle concentrazioni di prova (per determinare l'intervallo e/o la prova di tossicità finale), occorre tenere presente quanto segue:

per determinare il valore EC_x , le concentrazioni di prova devono includere il valore EC_x per garantire un intervallo di confidenza adeguato. Ad esempio, quando si valuta il valore EC_{50} , la concentrazione di prova più elevata deve essere superiore al valore EC_{50} . Se il valore EC_{50} si situa al di fuori dell'intervallo delle concentrazioni in esame i relativi intervalli di confidenza saranno ampi, il che rischia di impedire una valutazione corretta dell'adeguamento statistico del modello.

Quando la finalità è la valutazione della LOEC/NOEC, la concentrazione di prova più bassa deve essere sufficientemente contenuta per far sì che la sua crescita non sia notevolmente inferiore a quella dei controlli. Inoltre la concentrazione di prova più elevata deve essere sufficientemente alta per far sì che la sua crescita sia significativamente inferiore a quella del controllo. In caso contrario, occorrerà ripetere la prova utilizzando un intervallo di concentrazione diverso (a meno che la concentrazione più alta coincida con il limite di solubilità o con la concentrazione limite massima richiesta, ad esempio 100 mg/l).

27. Ciascuna prova deve prevedere gli stessi controlli senza la sostanza chimica in esame, ma identici in termini di mezzo nutritivo, organismo di prova (scegliendo il materiale vegetale più omogeneo possibile, rami laterali freschi delle pre-colture, accorciate a 2,5 cm dalla base), e le condizioni e procedure ambientali dei recipienti di prova. Qualora si utilizzi un solvente o un disperdente ausiliario, la prova deve includere un controllo supplementare con il solvente/disperdente alle stesse concentrazioni utilizzate nei recipienti di prova contenenti la sostanza chimica in esame. Devono essere previsti almeno dieci recipienti di controllo per le repliche (e recipienti che contengono il solvente, se del caso).

28. Se la determinazione della NOEC non è necessaria, la prova può essere modificata in modo da aumentare il numero di concentrazioni e ridurre il numero di repliche per concentrazione. Tuttavia occorre prevedere almeno dieci repliche di controllo.

Esposizione

29. I rami laterali freschi della pre-coltura accorciati a 2,5 cm dalla base sono ripartiti a random tra i recipienti di prova in condizioni asettiche. Ciascun recipiente di prova deve contenere un ramo laterale da 2,5 cm che presenti un meristema apicale a un'estremità. Il materiale vegetale scelto deve avere la stessa qualità in ciascun recipiente di prova.
30. La disposizione dei recipienti di prova nell'incubatore deve essere casuale per ridurre al minimo l'impatto delle differenze spaziali di intensità di luce o di temperatura. Anche quando si effettuano le osservazioni è necessaria una disposizione dei recipienti secondo un piano in blocchi o una disposizione casuale (o un riposizionamento più frequente).
31. Se una prova di stabilità preliminare indica che nel corso della prova (14 giorni) la concentrazione della sostanza chimica in esame non può essere mantenuta (ossia la concentrazione misurata diminuisce più dell'80 % della concentrazione misurata inizialmente), si raccomanda di impiegare una procedura sperimentale semistatica. In tal caso, occorre esporre le piante a soluzioni di prova e di controllo nuove almeno una volta durante la prova (per esempio, il 7° giorno). La frequenza dell'esposizione al nuovo mezzo dipenderà dalla stabilità della sostanza chimica in esame; una frequenza più elevata può essere necessaria per mantenere concentrazioni pressoché costanti nel caso di sostanze chimiche ad elevata volatilità o instabilità.
32. L'esposizione mediante un'applicazione fogliare (polverizzazione) non è contemplata nel presente metodo di prova.

Condizioni di prova

33. Occorre utilizzare un'illuminazione a fluorescenza bianca, calda o fredda, al fine di ottenere un'intensità luminosa tra 100 e 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ misurata in termini di radiazione fotosinteticamente attiva (400-700 nm) in punti equidistanti dalla fonte di luce, ad esempio il fondo dei recipienti di prova (equivalente a circa 6 000 — 9 000 lux) e con un ciclo luce-buio di 16:8 ore. Il metodo di individuazione e misurazione della luce, in particolare il tipo di sensore, influenzeranno il valore misurato. I sensori sferici (che rilevano la luce proveniente da tutti gli angoli situati sopra e sotto il piano di misurazione) e i sensori "cosinusoidali" (che rilevano la luce da tutti gli angoli situati al di sopra del piano di misurazione) sono preferibili ai sensori unidirezionali e indicheranno valori più elevati per una fonte luminosa multipla come quella qui descritta.
34. La temperatura dei recipienti di prova è pari a 23 (\pm 2) °C. Occorre prestare particolare attenzione alle variazioni del pH, in particolare quando si saggiano sostanze chimiche instabili e metalli. Il pH dovrà rimanere in un intervallo tra 6 e 9. Cfr. il riferimento (5) per indicazioni supplementari in materia.

Durata

35. La prova termina 14 giorni dopo il trasferimento delle piante nei recipienti di prova.

Misure e determinazioni analitiche

36. All'inizio della prova la lunghezza del germoglio principale dell'organismo di prova è pari a 2,5 cm (cfr. il paragrafo 29). Le misurazioni sono effettuate con un righello (cfr. appendice 4) o tramite fotografie e analisi delle immagini. La lunghezza del germoglio principale, indipendentemente dall'apparenza normale o anormale, va determinata all'inizio della prova, almeno una volta durante il periodo di esposizione di 14 giorni e fine prova. Nota: per i laboratori che non possono eseguire un'analisi delle immagini, se il piano di lavoro è sterilizzato prima dell'aggiunta di piante ai recipienti di prova, per la misurazione della lunghezza del germoglio principale all'inizio e alla fine della prova può essere usato anche un righello sterile. Occorre prendere nota delle modifiche nello sviluppo delle piante per quanto riguarda, per esempio, le deformazioni dei germogli, i segni di necrosi, clorosi, la frammentazione o diminuzione della galleggiabilità nonché la lunghezza e l'aspetto delle radici. Occorre prendere nota anche delle caratteristiche salienti del mezzo di prova (per esempio la presenza di materie non disciolte, lo sviluppo di alghe, funghi e batteri nel recipiente di prova).

37. Durante le prova, oltre a determinare la lunghezza del germoglio principale, si valutano gli effetti della sostanza chimica in esame su tre (o più) delle seguenti variabili di misurazione:
- i. lunghezza totale dei rami laterali
 - ii. lunghezza totale dei germogli
 - iii. lunghezza totale delle radici
 - iv. peso fresco
 - v. peso secco
 - vi. numero di verticilli
- Nota 1:* le osservazioni effettuate nel quadro della prova di determinazione dell'intervallo delle concentrazioni possono contribuire a scegliere di misurare ulteriori variabili pertinenti tra le sei variabili sopraelencate.
- Nota 2:* è altamente raccomandato di determinare il peso fresco e secco (parametri iv e v).
- Nota 3:* poiché il saccarosio e la luce (esposizione delle radici alla luce nel corso della prova) possono incidere sui vettori che trasportano l'auxina (ormone della crescita delle piante) e poiché alcune sostanze chimiche hanno modalità di azione simili a quelle delle auxine, l'interesse di misurare gli effetti sulle radici (parametro iii) è discutibile.
- Nota 4:* i risultati della prova interlaboratorio evidenziano elevati coefficienti di variazione (> 60 %) per la lunghezza totale dei rami laterali (parametro i). In ogni caso la lunghezza totale dei rami laterali è compresa nella misurazione della lunghezza totale dei germogli (parametro ii), per cui i coefficienti di variazione sono più accettabili (< 30 %).
- Nota 5:* in base alle considerazioni sopraesposte, gli endpoint di misurazione principali raccomandati sono: lunghezza totale dei germogli, peso fresco e peso secco (parametri ii, iv e v). La considerazione del parametro vi, ossia il numero di verticilli, è lasciata alla discrezione dell'operatore.
38. La lunghezza del germoglio principale e il numero di verticilli presentano il vantaggio di poter essere determinati per ciascun recipiente di prova e di controllo all'inizio, durante e a fine prova con fotografie e analisi delle immagini, sebbene possa essere usato anche un righello (sterile).
39. La lunghezza totale dei verticilli, la lunghezza totale delle radici (come somma di tutti i verticilli o radici laterali) e la lunghezza totale dei germogli (come somma della lunghezza del germoglio principale e lunghezza totale dei rami laterali) possono essere misurate con un righello a fine esposizione.
40. Il peso fresco e/o secco è stabilito all'inizio della prova da un campione della pre-coltura rappresentativo del materiale utilizzato per avviare la prova e a fine prova con il materiale vegetale di ciascun recipiente di prova e di controllo.
41. La lunghezza totale dei rami laterali, la lunghezza totale dei germogli, la lunghezza totale delle radici, il peso fresco, il peso secco e il numero di verticilli possono essere determinati come segue:
- i. lunghezza totale dei rami laterali: la lunghezza dei rami laterali può essere determinata misurando tutti i rami laterali con un righello a fine esposizione. La lunghezza totale dei rami laterali è la somma di tutti i rami laterali in ciascuna prova e in ciascun recipiente di prova e di controllo;
 - ii. lunghezza totale dei germogli: la lunghezza del germoglio principale può essere determinata tramite analisi delle immagini o con un righello. La lunghezza totale dei germogli è la somma della lunghezza totale dei rami laterali e della lunghezza del germoglio principale in ciascun recipiente di prova e di controllo a fine esposizione;

- iii. lunghezza totale delle radici: la lunghezza delle radici può essere determinata misurando tutte le radici con un righello a fine esposizione. La lunghezza totale delle radici è la somma della lunghezza di tutte le radici in ciascun recipiente di prova e di controllo;
- iv. peso fresco: il peso fresco può essere determinato pesando l'organismo di prova a fine esposizione. Tutto il materiale vegetale di ciascun recipiente di prova e di controllo sarà sciacquato con acqua distillata e asciugato tamponandolo con carta di cellulosa. Alla fine di questa procedura di preparazione il peso fresco può essere ottenuto mediante pesatura. La biomassa di partenza (peso fresco) è determinata a partire da un campione di germogli prelevato dallo stesso lotto utilizzato per inoculare i recipienti di prova;
- v. peso secco: in seguito alla procedura di preparazione per la determinazione del peso fresco, gli organismi di prova sono seccati a 60°C fino a raggiungere un peso costante. Questa massa corrisponde al peso secco. La biomassa di partenza (peso secco) è determinata a partire da un campione dell'organismo di prova prelevato dallo stesso lotto utilizzato per inoculare i recipienti di prova;
- vi. numero di verticilli: Vanno contati tutti i verticilli sul germoglio principale.

Frequenza delle misurazioni e determinazioni analitiche

42. Se si applica una procedura statica, il pH di ciascun recipiente trattato deve essere misurato a inizio e a fine prova. Se la procedura è semistatica, il pH deve essere misurato in ciascun lotto di soluzione di prova "nuova" prima di ogni rinnovo, così come nelle soluzioni "usate" corrispondenti.
43. L'intensità luminosa è misurata nella camera di crescita, nell'incubatore o nella stanza in punti equidistanti dalla fonte luminosa rispetto agli organismi di prova. Tali misurazioni devono essere effettuate almeno una volta nel corso della prova. La temperatura del mezzo è misurata almeno una volta al giorno (o in via continuativa con un *data logger*, ossia un registratore di dati) in un recipiente di prova appositamente allestito per questo scopo e conservato nelle stesse condizioni degli altri nella camera di crescita, nell'incubatore o nella stanza.
44. Durante la prova, le concentrazioni della o delle sostanze chimiche in esame sono determinate a congrui intervalli. Nelle prove statiche, le concentrazioni devono essere rilevate almeno a inizio e a fine prova.
45. Nelle prove semistatiche in cui si presume che le concentrazioni della sostanza chimica in esame non si mantengano entro un intervallo di $\pm 20\%$ della concentrazione nominale è necessario analizzare tutte le soluzioni di prova appena vengono preparate e al momento di ciascun rinnovo. Tuttavia, per le prove in cui le concentrazioni della sostanza chimica in esame misurate inizialmente non si situano in un intervallo di $\pm 20\%$ del valore nominale, ma in cui un numero sufficiente di indizi dimostra che le concentrazioni iniziali sono ripetibili e stabili (ossia nell'intervallo tra l'80% e il 120% della concentrazione iniziale), le determinazioni chimiche possono limitarsi solo alla concentrazione di prova più alta e a quella più bassa. In ogni caso, la determinazione delle concentrazioni oggetto di prova prima del rinnovo deve essere effettuata su un solo recipiente identico per ciascuna concentrazione di prova (o in un recipiente in cui si sarà mescolato il contenuto di tutti i recipienti trattati in modo identico).
46. Se è dimostrato che la concentrazione oggetto di prova è stata conservata in modo soddisfacente entro un intervallo di $\pm 20\%$ della concentrazione nominale o della concentrazione misurata inizialmente, l'analisi dei risultati può essere basata sui valori nominali o su quelli misurati inizialmente. Se lo scarto rispetto alla concentrazione nominale o quella misurata inizialmente è nel limite di $\pm 20\%$, l'analisi dei risultati dovrà basarsi sulla media geometrica della concentrazione durante l'esposizione o su modelli che descrivono la diminuzione della concentrazione della sostanza chimica in esame (5).

Prova limite

47. In determinate circostanze, per esempio quando una prova preliminare indica che la sostanza chimica in esame non ha effetti tossici in concentrazioni fino a 100 mg/l oppure fino al suo limite di solubilità nel mezzo di prova o in caso di una formulazione fino al limite della sua capacità di dispersione, può essere svolta una prova limite che consiste nel confrontare le risposte di un gruppo di controllo e di un gruppo trattato (a una concentrazione di 100 mg/l o pari al limite di solubilità della sostanza chimica in esame nel mezzo di prova). È vivamente raccomandato che l'assenza di tossicità sia corroborata da un'analisi della concentrazione di esposizione. Tutti i criteri di validità e le condizioni sperimentali descritti precedentemente si applicano alla prova limite, eccezion fatta per il numero delle repliche trattate, che deve essere raddoppiato. La crescita nel gruppo di controllo e nel gruppo trattato può essere analizzata mediante una prova statistica che consenta di paragonare le medie, per esempio un t-test di Student.

DATI E RELAZIONI

Variabili di risposta

48. La finalità di questa prova è determinare gli effetti della sostanza chimica in esame sulla crescita vegetativa del *Myriophyllum spicatum*. Il presente metodo di prova descrive due variabili di risposta.
- a) Tasso di crescita specifico medio: questa variabile di risposta è calcolata in funzione dell'evoluzione logaritmica della lunghezza del germoglio principale e in base all'evoluzione logaritmica di altri parametri di misurazione, ossia lunghezza totale dei germogli, peso fresco, peso secco o numero di verticilli nel tempo (espresso in giorni) nei gruppi di controllo e in ciascun gruppo trattato. Nota: per il parametro di misurazione dato dalla lunghezza totale dei rami laterali e della lunghezza totale delle radici non è possibile procedere a un calcolo del tasso di crescita specifico medio. All'inizio della prova l'organismo di prova non presenta né rami laterali, né radici (conformemente alla preparazione basata sulla pre-coltura). il valore di partenza è zero e il calcolo del tasso di crescita specifico medio non è definito.
- b) Rendimento: questa variabile di risposta è calcolata in funzione dell'evoluzione della lunghezza del germoglio principale nonché all'evoluzione di altri parametri di misurazione — ossia preferibilmente la lunghezza totale dei germogli, il peso fresco, il peso secco o il numero di verticilli, e di altri parametri eventualmente ritenuti utili — nei gruppi di controllo e in ciascun gruppo trattato fino alla fine della prova.
49. Le stime sulla tossicità sono basate sulla lunghezza del germoglio principale e su altre tre variabili di misurazione (ossia di preferenza la lunghezza totale dei germogli, il peso fresco, il peso secco o il numero di verticilli — cfr. il paragrafo 37 e le note 2, 4 e 5 del presente paragrafo), poiché alcune sostanze chimiche potrebbero condizionare altre variabili di misurazione molto più della lunghezza media del germoglio principale. Questo effetto potrebbe passare inosservato se il calcolo si basasse unicamente sulla lunghezza dei germogli.

Tasso di crescita specifico medio

50. Il tasso di crescita specifico medio per un determinato periodo è calcolato in funzione dell'aumento logaritmico delle variabili di crescita — lunghezza del germoglio principale e tre ulteriori variabili di misurazione (ossia lunghezza totale dei germogli, peso fresco, peso secco, o numero di verticilli) — utilizzando la formula riportata qui di seguito per ciascuna replica dei gruppi di controllo e dei gruppi trattati:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

laddove:

μ_{i-j} : tasso di crescita specifico medio dal momento i al momento j

N_i : variabile di misurazione nel recipiente di prova o di controllo al momento i

N_j : variabile di misurazione nel recipiente di prova o di controllo al momento j

t: periodo di tempo tra i e j

Per ciascun gruppo trattato e di controllo, calcolare un tasso di crescita a medio termine e le stime della varianza.

51. Occorre calcolare il tasso di crescita specifico medio per l'intero periodo di prova (il momento "i" citato nella formula corrisponde all'inizio della prova e il momento "j" corrisponde alla fine della prova). Per ciascuna concentrazione dei gruppi trattati e di controllo, calcolare il valore medio del tasso di crescita specifico medio e le stime della varianza. Occorre inoltre valutare il tasso di crescita in ogni fase del periodo di esposizione nell'arco della prova per verificare gli effetti della sostanza chimica in esame durante il periodo di esposizione (per esempio, analizzando le curve di crescita dopo la trasformazione logaritmica).

52. La percentuale di inibizione del tasso di crescita (I_r) può essere successivamente calcolata per ciascuna concentrazione di prova (gruppo trattato) secondo la formula seguente:

$$\%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100$$

laddove:

$\% I_r$: percentuale di inibizione del tasso di crescita specifico medio

μ_c : valore medio di μ nel gruppo di controllo

μ_T : valore medio di μ nel gruppo trattato

Rendimento

53. Gli effetti sul rendimento sono determinati in funzione di due variabili di misurazione: la lunghezza del germoglio principale e tre ulteriori variabili di misurazione (ossia preferibilmente la lunghezza totale dei germogli, il peso fresco, il peso secco o il numero di verticilli) in ciascun recipiente di prova all'inizio e al termine della prova. Per quanto riguarda il peso fresco o il peso secco, la biomassa di partenza è determinata a partire da un campione di organismi di prova prelevato dallo stesso lotto utilizzato per inoculare i recipienti di prova. Per ciascuna concentrazione di prova e di controllo, occorre calcolare un valore medio di rendimento nonché le stime della varianza. Per ogni gruppo trattato la percentuale media di inibizione del rendimento ($\% I_y$) può essere calcolata secondo la formula seguente:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

laddove:

$\% I_y$: percentuale di riduzione del rendimento,

b_c : biomassa finale meno la biomassa di partenza nel gruppo di controllo

b_T : biomassa finale meno la biomassa di partenza nel gruppo trattato

Tempo di raddoppio

54. Per determinare il tempo di raddoppio (T_d) della lunghezza del germoglio principale e verificare se lo studio rispetta questo criterio di validità (cfr. il paragrafo 8), ai dati risultanti dai recipienti di controllo si applica la seguente formula:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

laddove μ è il tasso di crescita specifico medio determinato secondo quanto indicato nei paragrafi 50-52.

Tracciato delle curve concentrazione-risposta

55. Occorre tracciare curve concentrazione-risposta che raffigurano la percentuale d'inibizione media della variabile di risposta (I_r oppure I_y calcolate come indicato al paragrafo 53) e il logaritmo della concentrazione della sostanza chimica in esame.

Stima del valore EC_x

56. Le stime del valore EC_x devono basarsi sia sul tasso di crescita specifico medio ($E_r C_x$), sia sul rendimento ($E_y C_x$), e ciascuna di queste variabili in esame deve essere a sua volta basata sulla lunghezza del germoglio principale, sul peso fresco, sul peso secco o sul numero di verticilli). Questo perché esistono sostanze chimiche che hanno un impatto diverso sulla lunghezza del germoglio principale e su altre variabili di misurazione. I parametri di tossicità ricercati corrispondono pertanto a quattro valori di EC_x per ciascun livello di inibizione x calcolato: $E_r C_x$ (lunghezza del germoglio principale); $E_r C_x$ (ossia preferibilmente lunghezza totale dei germogli, peso fresco, peso secco o numero di verticilli); $E_y C_x$ (lunghezza del germoglio principale); ed $E_y C_x$ (ossia preferibilmente lunghezza totale dei germogli, peso fresco, peso secco o numero di verticilli);

57. Occorre rilevare che i valori di EC_x calcolati utilizzando queste due variabili di risposta non sono comparabili e che occorre tenere conto di questa differenza quando si utilizzano i risultati della prova. I valori di EC_x basati sul tasso di crescita specifico medio ($E_r C_x$) saranno generalmente superiori a quelli basati sul rendimento ($E_y C_x$), se le condizioni del presente metodo di prova sono rispettate, a motivo del fondamento matematico dei rispettivi approcci. Questa differenza è dovuta solo al calcolo matematico e non va interpretata come una differenza di sensibilità tra le due variabili in esame.

Procedure statistiche

58. L'obiettivo è ottenere una relazione quantitativa concentrazione-risposta mediante un'analisi della regressione. È possibile utilizzare una regressione lineare ponderata, preceduta da una trasformazione linearizzante dei dati di risposta — per esempio con modelli probit, logit o Weibull (7), ma è preferibile applicare metodi di regressione non lineare in quanto tengono conto meglio delle inevitabili irregolarità dei dati e degli scarti rispetto alle distribuzioni regolari. Vicine allo zero o all'inibizione totale, queste irregolarità possono essere amplificate dalla trasformazione e interferire con l'analisi (7). Si fa presente che i metodi analitici standard che utilizzano le trasformazioni probit, logit, o Weibull si applicano a dati quantali (per esempio, mortalità o sopravvivenza) e devono quindi essere modificati per poter essere utilizzati con i dati relativi alla crescita o al rendimento. Per le procedure specifiche che consentono di determinare i valori EC_x a partire da dati continui si vedano i riferimenti (8)(9) e (10).
59. Per ciascuna variabile di risposta da analizzare, occorre utilizzare il rapporto concentrazione-risposta per calcolare stime puntuali dei valori EC_x . Laddove possibile, occorre determinare gli intervalli di confidenza a 95 % per ogni stima. La corrispondenza dei dati che descrivono gli effetti rispetto al modello di regressione va valutata graficamente o statisticamente. L'analisi della regressione deve essere effettuata basandosi sulle reazioni rilevate in ogni recipiente replicato e non sulle medie dei gruppi trattati.
60. Le stime di EC_{50} e gli intervalli di confidenza possono essere ottenuti anche mediante interpolazione lineare con *bootstrapping* (10), se i modelli o i metodi di regressione disponibili non sono adatti ai dati.
61. Per stimare la LOEC, e dunque la NOEC, è necessario paragonare le medie dei gruppi trattati mediante un'analisi della varianza (ANOVA). La media di ogni concentrazione è poi confrontata con la media dei controlli mediante un metodo adeguato di comparazione multipla o un metodo di tendenza. Possono risultare utili i test di Dunnett o di William (12) (13), (14), (15), (16). È necessario controllare se l'ipotesi di omogeneità della varianza dell'ANOVA è fondata. Si raccomanda di effettuare questo controllo graficamente o con un test formale (15). A tale fine si prestano il test di Levene o quello di Bartlett. Se l'ipotesi dell'omogeneità della varianza non si conferma, a volte si possono correggere i dati mediante una trasformazione logaritmica. Se l'eterogeneità della varianza è estrema e non può essere corretta mediante una trasformazione, si prenderanno in considerazione metodi di analisi della tendenza come, ad esempio, i test di tendenza regressivi di Jonckheere. Ulteriori riferimenti sulla determinazione della NOEC sono reperibili al riferimento 10.
62. Alcuni progressi recenti hanno portato i ricercatori ad auspicare l'abbandono della nozione di NOEC a vantaggio di stime puntuali di EC_x basate sulla regressione. Per questa prova sul *Myriophyllum* non sono stati fissati valori adeguati di x . Tuttavia un intervallo dal 10 % al 20 % sembra appropriato (in funzione della variabile di risposta scelta) e nella relazione è preferibile riportare sia l' EC_{10} sia EC_{20} , con i rispettivi intervalli di confidenza.

Relazioni

63. La relazione sulla prova include le informazioni indicate di seguito.

Sostanza chimica in esame

Sostanza mono-costituente

— apparenza fisica, idrosolubilità e, se del caso, ulteriori proprietà fisico-chimiche;

— identificazione chimica, come la denominazione IUPAC o CAS, il numero CAS, il codice SMILES o InChI, la formula strutturale, l'identità chimica o le impurità, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc. (incluso il tenore di carbonio organico, se opportuno).

Sostanza multi-costituente, UVCB o miscela:

- caratterizzata nella massima misura possibile con l'identità chimica (vedasi sopra), con la presenza quantitativa e con le proprietà fisico-chimiche pertinenti dei costituenti.

Specie in esame

- Nome scientifico e fonte.

Condizioni di prova

- Procedura sperimentale utilizzata (statica o semistatica).
- Data dell'inizio della prova e durata della prova.
- Mezzo di prova.
- Descrizione del disegno sperimentale: recipienti e coperchi, volumi delle soluzioni, lunghezza del germoglio principale per recipiente di prova a inizio prova.
- Concentrazioni di prova (nominali e misurate in funzione delle esigenze), numero di repliche per concentrazione.
- Metodi di preparazione delle soluzioni madre e delle soluzioni di prova, ivi compreso l'uso di eventuali solventi o disperdenti.
- Temperatura nel corso della prova.
- Fonte di luce, intensità luminosa e omogeneità.
- Valori del pH dei mezzi di prova e di controllo.
- Metodo di analisi della sostanza chimica in esame e dati adeguati per la valutazione della qualità (studi di convalida, scarti tipo o intervalli di confidenza delle analisi).
- Metodi di determinazione della lunghezza del germoglio principale e delle altre variabili di misurazione, ad es. lunghezza totale dei rami laterali, lunghezza totale dei germogli, lunghezza totale delle radici, peso fresco, peso secco o numero di verticilli.
- Stato della coltura (sterile o non sterile) di ciascun recipiente di prova e di controllo a ogni osservazione.
- Tutte le differenze rispetto al presente metodo di prova.

Risultati

- Dati grezzi: lunghezza del germoglio principale e altre variabili di misurazione in ciascun recipiente di prova e di controllo per ciascuna osservazione e analisi.
- Medie e scarti tipo per ciascuna variabile di misurazione.
- Curve di crescita per ciascuna variabile di misurazione.
- Calcolo delle variabili studiate per ciascun replicato, con valore medio e coefficiente di variazione dei replicati.
- Rappresentazione grafica della relazione concentrazione/effetto,
- Stime degli endpoint tossici per le variabili di risposta: ad esempio EC_{50} , EC_{10} , EC_{20} , e relativi intervalli di confidenza. Se calcolate, la LOEC e/o la NOEC e i metodi statistici utilizzati per determinarle.
- Se è stata praticato un test ANOVA, la portata dell'effetto individuabile (ad esempio, la differenza meno significativa).
- Stimoli alla crescita eventualmente osservati in un gruppo trattato.
- Eventuali segni di fitotossicità e osservazioni delle soluzioni di prova.
- Analisi dei risultati, compresa l'influenza sul risultato del test risultante dagli scostamenti dal presente metodo di prova.

BIBLIOGRAFIA

- (1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.
 - (2) Maletzki, D. *et al.* (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch*, No. 22, pp. 702–710.
 - (3) Capitolo C.26 del presente allegato, *Saggio di inibizione della crescita di Lemna sp.*
 - (4) OCSE (2014), “*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris.
 - (5) OCSE (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO (2000)6, OECD, Paris.
 - (6) Capitolo C.51 del presente allegato, Prova di tossicità sul *Myriophyllum spicatum* in un sistema di prova acqua-sedimento.
 - (7) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.
 - (8) Nyholm, N. *et al.* (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/2, pp. 157-167.
 - (9) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, pp. 1485-1494.
 - (10) OCSE (2006), “Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.
 - (11) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.
 - (12) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.
 - (13) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.
 - (14) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.
 - (15) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.
 - (16) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp. 93-96.
-

Appendice 1

DEFINIZIONI

Biomassa: peso fresco e/o secco della materia vivente presente in una popolazione. Nella presente prova la biomassa comprende il germoglio principale, tutti i rami laterali e tutte le radici.

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

Clorosi: il cambiamento di colore di un organismo di prova, in particolare dei germogli, dal verde a un colore tendente al giallo.

EC_x: concentrazione della sostanza chimica in esame disciolta nel mezzo di prova che determina una riduzione dell' x % (per esempio, 50 %) della crescita di *Myriophyllum spicatum* entro un periodo di esposizione definito (che deve essere esplicitato se diverso dalla durata totale o normale della prova). Per indicare in modo inequivoco se il valore EC si riferisce al tasso di crescita o al rendimento si utilizzano le abbreviazioni "E_rC" per il tasso di crescita e "E_rC" per il rendimento, seguite dalla variabile di misurazione utilizzata, ad esempio E_rC (lunghezza del germoglio principale).

Crescita: aumento della variabile di misurazione, ad esempio la lunghezza del germoglio principale, la lunghezza totale dei rami laterali, la lunghezza totale dei germogli, la lunghezza totale delle radici, il peso fresco, il peso secco o il numero di verticilli, nel corso del periodo di prova.

Tasso di crescita: (tasso di crescita specifico medio): aumento logaritmico della variabile di misurazione durante il periodo di esposizione. *Nota:* La risposta relativa al tasso di crescita è indipendente dalla durata della prova a condizione che gli organismi di controllo non esposti siano soggetti a un andamento di crescita esponenziale.

Concentrazione minima a cui si osserva un effetto statisticamente significativo (LOEC — *Lowest Observed Effect Concentration*): la concentrazione più bassa saggiata di una sostanza alla quale si osserva un effetto di riduzione statisticamente significativo della crescita ($p < 0,05$) rispetto al controllo, nell'arco di un periodo di esposizione definito. Tutte le concentrazioni di prova superiori alla LOEC, tuttavia, devono avere un effetto dannoso uguale o superiore a quello osservato per la LOEC. Quando queste due condizioni non possono essere soddisfatte occorre fornire una spiegazione dettagliata per spiegare come è stata scelta la LOEC (e di conseguenza la NOEC).

Variabile di misurazione: qualsiasi tipo di variabile che viene misurata per esprimere l'endpoint della prova utilizzando una o più variabili di risposta. Nella presente prova le variabili di misurazione consistono nella lunghezza del germoglio principale, nella lunghezza totale dei rami laterali, nella lunghezza totale dei germogli, nella lunghezza totale delle radici, nel peso fresco, nel peso secco e nel numero di verticilli.

Monocultura: coltura con una sola specie vegetale.

Necrosi: tessuto morto (ossia di aspetto bianco o marrone scuro) dell'organismo di prova.

Concentrazione senza effetti osservati (NOEC — *No Observed Effect Concentration*): concentrazione di prova immediatamente inferiore alla LOEC.

Variabile di risposta: la variabile per la stima della tossicità derivata da qualsiasi parametro misurato che descrive la biomassa mediante metodi diversi di calcolo. Nel presente metodo di prova, il tasso e il rendimento di crescita sono variabili di risposta derivate dalle variabili di misurazione come la lunghezza del germoglio principale, la lunghezza totale dei germogli, il peso fresco, il peso secco o il numero di verticilli.

Prova semistatica (con rinnovo): prova in cui la soluzione di prova è periodicamente sostituita a determinati intervalli durante la prova.

Prova statistica: prova senza rinnovo della soluzione di prova durante la prova.

Sostanza chimica in esame: qualsiasi sostanza o miscela saggiata seguendo il presente metodo di prova.

Endpoint della prova: indica il fattore generale che sarà modificato, rispetto al controllo, dalla sostanza chimica in esame. Nel presente metodo di prova l'endpoint è l'inibizione della crescita che può essere espressa da più variabili di risposta dedotte da una o più variabili di misurazione.

Mezzo di prova: mezzo di crescita sintetico completo in cui le piante sperimentali crescono quando sono esposte alla sostanza chimica in esame. Quest'ultimo è di norma disciolto nel mezzo di prova.

UVCB: una sostanza di composizione sconosciuta o variabile, il prodotto di una reazione complessa o materiale biologico.

Rendimento: valore di una variabile di misurazione che esprime la differenza tra la biomassa al termine del periodo di esposizione e il valore della stessa variabile all'inizio del periodo di esposizione. Nota: quando l'andamento della crescita è esponenziale, le variabili di risposta basate sul rendimento diminuiscono con l'aumento della durata della prova.

Appendice 2

MEZZO DI PROVA DI ANDREWS MODIFICATO PER COLTURE MADRE E PRE-COLTURE

Il mezzo di prova di Andrews modificato necessario per le pre-colture e le colture madre è preparato partendo da cinque soluzioni madre nutritive elaborate separatamente, cui va aggiunto un 3 % di saccarosio.

Tabella 1

Composizione della soluzione nutritiva di Andrews': (Designazione ASTM: E 1913-04)

Produzione di soluzioni madre nutritive			Produzione della soluzione nutritiva
Soluzione madre	Sostanza chimica	Peso iniziale per 1 000 ml	ml per 5 l di soluzione nutritiva
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO ₃	8,08 g	
	Ca(NO ₃) ₂ × 4 H ₂ O	18,88 g	
2	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	9,86 g	50
3	cfr. la soluzione madre di cui al punto 3.1		50
4	KH ₂ PO ₄	2,72 g	50
5	FeSO ₄ × 7 H ₂ O	0,278 g	50
	Na ₂ EDTA × 2 H ₂ O	0,372 g	

Le soluzioni madre possono essere conservate in frigorifero per 6 mesi (a una temperatura compresa tra i 5 e i 10 °C). Solo la soluzione madre n. 5 ha una durata di conservazione inferiore (due mesi).

Tabella 2

Produzione della soluzione madre n. 3.1 che serve per la preparazione della soluzione madre n. 3.

Sostanza chimica	Peso iniziale in g/100 ml
MnSO ₄ × 4 H ₂ O	0,223
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,115
H ₃ BO ₃	0,155
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,0125
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4 H ₂ O	0,0037

Una volta ottenuta la soluzione madre n. 3.1 (tabella 2), è necessario congelarla (a una temperatura di almeno - 18 °C) in aliquote di circa 11 ml. Queste porzioni congelate hanno una durata di conservazione di cinque anni.

Per la preparazione della soluzione madre 3, scongelare la soluzione 3.1, versarne 10 ml in un matraccio tarato da 1 litro e aggiungere dell'acqua distillata ultrapura fino all'apposito segno sul matraccio.

Per ottenere un mezzo di prova di Andrews modificato, versare circa 2 500 ml di acqua distillata ultrapura in un matraccio tarato a 5 l. Aggiungere 50 ml di ciascuna soluzione madre, riempire il 90 % del matraccio con acqua distillata ultrapura e portare a un pH di 5,8.

In seguito, aggiungere 150 g di saccarosio disciolto (3 % per 5 l); successivamente riempire il matraccio con acqua distillata ultrapura fino all'apposito segno. Infine, versare la soluzione nutritiva in matracci Schott da 1 l e sottoporre a trattamento in autoclave a 121 °C per 20 minuti.

La soluzione nutritiva così ottenuta può essere mantenuta in stato sterile in un frigorifero (a 5-10 °C) per tre mesi.

Mezzo di prova di Andrews per prove di tossicità senza sedimenti

Per ottenere le soluzioni di prova, si parte dalle cinque soluzioni madre nutritive già menzionate nelle tabelle 1 e 2 e si prepara un mezzo di prova di Andrews non modificato con concentrazione decuplicata, con un'aggiunta di saccarosio pari al 30 %. Per fare ciò è necessario versare circa 100 ml di acqua distillata ultrapura in un matraccio tarato a 1 l. Aggiungere 100 ml di ciascuna delle succitate soluzioni madre, raggiungere un pH di 5,8. In seguito, aggiungere il 30 % di saccarosio disciolto (300 g per 1 000 ml); successivamente riempire il matraccio con acqua distillata ultrapura fino all'apposito segno.

Infine, versare la soluzione nutritiva in matracci Schott da 0,5 l e porre in autoclave a 121 °C per 20 minuti.

La soluzione nutritiva modificata e concentrata così ottenuta può essere mantenuta in stato sterile in un frigorifero (a 5-10 °C) per tre mesi.

Appendice 3

MANTENIMENTO DI UNA COLTURA MADRE

Nella presente appendice 3 si descrive la coltura madre *Myriophyllum spicatum* L. ⁽¹⁾, una specie di piante acquatiche sommerse della classe delle dicotiledoni, del genere delle millefoglie d'acqua. Tra giugno e agosto produce dei fiori non molto appariscenti di color rosa-bianco che emergono dallo specchio d'acqua. Le radici delle piante sono ancorate al suolo con un sistema di rizomi robusti. Queste piante crescono nell'intero emisfero boreale in acque stagnanti eutrofiche ma non inquinate e con un tenore di calcio piuttosto elevato, con un substrato fangoso. Il *Myriophyllum spicatum* predilige l'acqua dolce, ma cresce anche in acque salmastre.

Per creare una coltura madre in un sistema senza sedimento a condizioni di laboratorio è necessario ricorrere a piante sterili. Tali piante possono essere reperite dal laboratorio ecotossicologico dell'Ufficio federale tedesco per l'ambiente (*Deutsches Umweltbundesamt*).

In alternativa gli organismi di prova possono essere preparati usando piante non sterili conformemente alla designazione ASTM E 1913-04. Il seguente estratto dalla guida generale ASTM descrive la procedura necessaria per ottenere una coltura di *Myriophyllum sibiricum* reperiti in natura:

“Se si opta per la raccolta di piante non sterili in natura, si raccomanda di raccogliere i turioni in autunno. Inserire i turioni in un acquario da 20 l che contiene 5 cm di sedimento sterile coperto da sabbia di silicea ad esempio da Turface® e 18 l di acqua di reazione. Aerare l'acquario e mantenerlo a una temperatura di 15 °C con un flusso tra i 200 e i 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ per 16 ore al giorno. La coltura di piante nell'acquario può essere mantenuta come fonte di riserva di piante nel caso in cui le colture di piante sterili fossero distrutte da malfunzionamenti meccanici nella camera di crescita o per altre ragioni. Le piante cresciute nell'acquario non sono sterili e le colture sterili non possono essere conservate in un sistema di coltura in batch. Al fine di sterilizzare la coltura, le piante sono rimosse dall'acquario e sciacquate con acqua corrente deionizzata per circa 0,5 h. In condizioni asettiche in una camera con flusso d'aria laminare, le piante sono disinfettate per meno di 20 minuti (fino a quando i tessuti della maggior parte delle piante non sono sbiancati e rimane verde solo l'apice in crescita) in una soluzione di ipoclorito di sodio al 3 % (peso/volume) contenente lo 0,01 % di un tensioattivo idoneo. Agitare il disinfettante e il materiale vegetale. I segmenti che presentano diversi nodi sono trasferiti in tubi di coltura sterili che contengono 45 ml di mezzo di prova di Andrews sterile modificato e sono chiusi con tappi standard. In ogni camera di prova va inserito un solo segmento vegetale. Per far sì che i recipienti di prova siano ben chiusi, la sigillazione avviene con pellicola da laboratorio. Una volta stabilita la coltura stabile, i segmenti vegetali che presentano diversi nodi vanno trasferiti nelle nuove camere di prova che contengono mezzo nutritivo liquido fresco preparato ogni dieci-dodici giorni. Come dimostrato con la creazione di colture su piastra di agar, le piante devono essere sterili e rimanere tali per otto settimane prima che si possa iniziare la prova.”

Poiché il mezzo di prova di Andrews modificato contiene saccarosio (che stimola la crescita di funghi e batteri), tutti i materiali, le soluzioni e la creazione di colture vanno tenuti in condizioni sterili. Tutti i liquidi e tutta l'attrezzatura sono sterilizzati prima dell'uso. La sterilizzazione avviene tramite un trattamento termico ad aria calda (210 °C) dalla durata di 4 ore o tramite un trattamento in autoclave di 20 minuti a 121 °C. Inoltre, tutti i matracci, le piastre, le ciotole, ecc. e le altre attrezzature sono sottoposti a trattamento a fiamma su un piano di lavoro sterilizzato immediatamente prima dell'uso.

Le colture madre possono essere conservate a bassa illuminazione e temperatura (50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 20 \pm 2 °C) per lunghi periodi senza che occorra ristabilirle. Il mezzo di crescita del *Myriophyllum* può essere identico a quello utilizzato per le prove, ma è possibile utilizzare anche altri mezzi ricchi di nutrienti per le colture madre.

I segmenti vegetali sono distribuiti in maniera axenica in diversi matracci Erlenmeyer da 500 ml e/o matracci Fernbach da 2 000 ml, con un contenuto per ciascun matraccio di rispettivamente 450 ml o 1 000 ml di mezzo di prova di Andrews modificato. In seguito i matracci sono chiusi in maniera axenica con tappi di cellulosa.

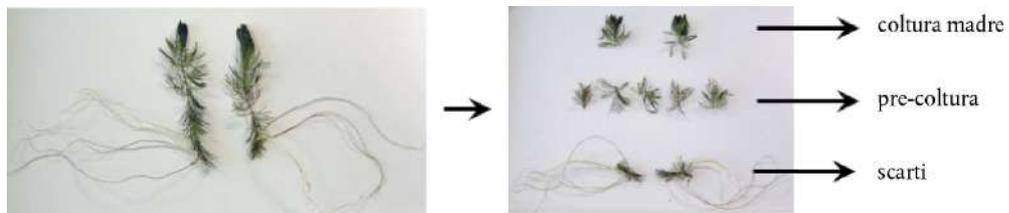
Oltre a ciò è assolutamente necessario sottoporre a trattamento a fiamma su un piano di lavoro sterilizzato immediatamente prima dell'uso. In funzione del numero e delle dimensioni, le piante vanno trasferite in una soluzione nutritiva fresca circa ogni tre settimane.

Per questa coltura rinnovata è possibile usare apici e segmenti della parte centrale del fusto. Il numero e la dimensione delle piante (o dei segmenti vegetali) dipendono dalla quantità di piante necessaria. Ad esempio, è possibile trasferire cinque segmenti di germoglio nel matraccio Fernbach e tre segmenti di germoglio in un matraccio Erlenmeyer, ciascuno con una lunghezza di 5 cm. Scartare tutte le parti che presentano radici, fioriture, componenti morte o altri elementi evidenti.

⁽¹⁾ Carl von Linné (* 23 maggio, 1707 a Råshult/Älmhult; † 10 gennaio 1778 a Uppsala).

Figura 1

sezionamento delle piante per la coltura madre e la pre-coltura dopo 3 settimane di coltivazione.



La coltivazione delle piante avviene in matracci Erlenmeyer da 500 ml e in flaconi Fernbach da 2 000 ml in un incubatore di raffreddamento a $20 (\pm 2) ^\circ\text{C}$ con illuminazione costante a $100\text{-}150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o $6\ 000\text{-}9\ 000 \text{ Lux}$ (emessa dalla camera di illuminazione con una temperatura di colore corrispondente a una "luce bianca calda").

Figura 2

Coltivazione di piante in un incubatore di raffreddamento in camera illuminata.



Occorre utilizzare recipienti di coltura in vetro sterili e chimicamente puliti (lavati con acido) e manipolare il materiale secondo tecniche asettiche. In caso di contaminazione della coltura madre, ad es. da alghe, funghi e/o batteri, per rinnovarla va preparata una nuova coltura o coltura madre proveniente da un altro laboratorio.

Appendice 4

MANTENIMENTO DI UNA PRE-COLTURA E PREPARAZIONE DI UN ORGANISMO DI PROVA

Per ottenere una pre-coltura, tagliare i germogli della coltura madre in segmenti, ciascuno con due verticilli. Inserire questi segmenti nei matracci Fernbach riempiti con mezzo di prova di Andrews modificato (con 3 % di saccarosio). Ciascun matraccio può contenere fino a 50 segmenti di germoglio. Tuttavia è necessario far sì che i segmenti siano vitali e non presentino nessuna radice, né rami laterali, né le loro gemme (cfr. la figura 1 dell'appendice 3).

La pre-coltura dura da 14 a 21 giorni in condizioni sterili in una camera ambientale con fasi alternate buio/luce di 16:8 ore. L'intensità luminosa sarà compresa tra 100 e 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La temperatura nei recipienti di prova deve essere mantenuta a 23 (± 2) °C.

Poiché il mezzo di prova di Andrews modificato contiene saccarosio (che stimola la crescita di alghe, funghi e batteri), sia la preparazione delle soluzioni della sostanza chimica in esame, sia la creazione di colture vanno condotte in condizioni sterili. Tutti i liquidi e tutta l'attrezzatura sono sterilizzati prima dell'uso. La sterilizzazione avviene tramite un trattamento termico ad aria calda (210 °C) dalla durata di 4 ore o tramite trattamento in autoclave di 20 minuti a 121 °C. Inoltre, tutti i matracci, le piastre, le ciotole, ecc. e le altre attrezzature sono sottoposti a trattamento a fiamma su un piano di lavoro sterilizzato immediatamente prima dell'uso.

I germogli sono rimossi in maniera axenica dai matracci che contengono le pre-culture, avendo cura di scegliere, nei limiti del possibile, materiale omogeneo. Ciascuna sperimentazione richiede almeno 60 organismi sperimentali (con otto concentrazioni chimiche di prova). Per la prova è necessario servirsi di rami laterali freschi di pre-culture, accorciare a 2,5 dalla base (misurazione con righello) e trasferirli in un becher che contiene mezzo di prova di Andrews modificato. I rami laterali freschi possono essere usati per il test di tossicità di *Myriophyllum spicatum* in un sistema senza sedimenti.

Figura 2

Taglio delle piante della pre-coltura per il test di tossicità su *Myriophyllum spicatum* in un sistema senza sedimenti