

C.51 Prova di tossicità su *Myriophyllum spicatum* in un sistema di prova acqua-sedimento

INTRODUZIONE

1. Questo metodo di prova è equivalente alla linea guida dell'OCSE per le prove sulle sostanze chimiche n. 239 (2014). Sono disponibili metodi di prova per specie di *Lemna*, piante acquatiche flottanti della classe delle monocotiledoni (1), e per specie di alghe (2). Questi metodi sono usati di routine per generare dati per individuare i rischi che comportano le sostanze chimiche in esame, in particolare le sostanze chimiche con attività erbicide, per le specie vegetali acquatiche non bersaglio. Tuttavia in alcuni casi possono risultare necessari ulteriori dati per altri macrofiti. Secondo un documento di orientamento pubblicato di recente nel quadro di un workshop dalla SETAC (*Society of Environmental Toxicology and Chemistry*) sulla valutazione del rischio per i macrofiti acquatici legato ai pesticidi (AMRAP), in certi casi può essere necessario disporre di dati sugli effetti su specie di macrofiti con radici di sostanze chimiche in esame alle quali è noto che la specie *Lemna* e le alghe non sono sensibili o il cui coefficiente di ripartizione con il sedimento indica una possibile esposizione attraverso le radici (3). Sulla base delle conoscenze ed esperienze attuali, le specie di *Myriophyllum spicatum* sono state selezionate come specie di elezione in casi in cui i dati da reperire riguardano specie di dicotiledoni sommerse e con radici (4) (5) (6). La presente prova non sostituisce altre prove di tossicità acquatica, ma è volta piuttosto a integrarle per consentire una maggiore completezza della valutazione del pericolo e dei rischi per la flora acquatica. Il metodo di prova su *Myriophyllum spicatum* in un sistema di prova acqua-sedimento integra il test di tossicità su *Myriophyllum spicatum* in un sistema di prova senza sedimento (7).
2. Il presente documento descrive il metodo di prova che consente di valutare gli effetti di una sostanza chimica in esame sulla specie di pianta acquatica con radici *Myriophyllum spicatum* in un sistema acqua-sedimento. Il metodo di prova si basa parzialmente su metodi esistenti (1), (2) (8) e tiene conto delle recenti ricerche legate alla valutazione del rischio legato a piante acquatiche (3). Il metodo acqua-sedimento è stato validato da una prova interlaboratorio internazionale condotta con *Myriophyllum spicatum* coltivati in situazioni statiche ed esposti alla sostanza chimica in esame per mezzo di applicazioni tramite colonna d'acqua (9). Tuttavia, il sistema di prova è facilmente adattabile a un'esposizione tramite sedimento addizionato o un'esposizione tramite la fase acquatica in scenari semistatici o a dose pulsata, sebbene tali scenari non siano stati formalmente oggetto di prove interlaboratorio. Inoltre, il metodo generale può essere usato per altre specie con radici, sommerse o emergenti, incluse altre specie di *Myriophyllum spicatum* (ad es. *Myriophyllum aquaticum*) e *Glyceria maxima* (10). In caso di prove su altre specie può essere necessario adeguare le condizioni di prova, il disegno sperimentale e la durata. In particolare, sono necessari maggiori interventi per definire procedure appropriate per *Myriophyllum aquaticum*. Queste opzioni non sono presentate in dettaglio nel presente metodo di prova, che descrive l'approccio standard per l'esposizione di *Myriophyllum spicatum* in un sistema statico tramite la fase acquatica.
3. Il presente metodo di prova si applica alle sostanze per le quali il metodo è stato validato (per maggiori dettagli si rimanda alla relazione sulla prova interlaboratorio (9), alle formulazioni o a miscele conosciute. Una prova su *Myriophyllum* può essere condotta per soddisfare la necessità di disporre di dati più generici (di primo livello — *Tier 1*) originata da una possibile ripartizione della sostanza chimica in esame nel sedimento o per questioni relative alla modalità di azione/selettività. Analogamente, una prova di laboratorio su *Myriophyllum* può essere richiesta nel quadro di una strategia più specifica (*higher tier*) volta a rispondere alle preoccupazioni in merito al rischio per le piante acquatiche. La motivazione specifica per la conduzione di una prova determinerà la via di esposizione (ossia acqua o sedimento). Prima dell'uso del metodo di prova su una miscela, per la generazione di dati per un determinato scopo normativo, occorre esaminare se, e in caso affermativo perché, può fornire risultati adeguati a tale scopo. Tali considerazioni non sono necessarie in presenza di un obbligo normativo di prova sulla miscela.

PRINCIPIO DELLA PROVA

4. La prova è impostata in modo da valutare gli effetti legati a sostanze chimiche sullo sviluppo vegetativo di piante di *Myriophyllum* coltivate in mezzi standardizzati (acqua, sedimento e nutrienti). A tal fine, gli apici dei germogli di piante sane e non in fiore sono inseriti in sedimento standardizzato e artificiale, arricchito con altri nutrienti per garantire un'adeguata crescita della pianta e in seguito mantenuto in un mezzo di prova di Smart e Barko (appendice 1). Trascorso un periodo di impianto che consente la formazione di radici, le piante sono esposte a una serie di concentrazioni di prova aggiunte alla colonna d'acqua. In alternativa, l'esposizione tramite il sedimento può essere simulata aggiungendo la sostanza chimica in esame al sedimento artificiale e trasferendo le piante in tale sedimento addizionato. In entrambi i casi le piante sono successivamente tenute in condizioni ambientali controllate per 14 giorni. Gli effetti sulla crescita sono determinati dalla valutazione quantitativa della lunghezza del germoglio, del peso fresco e del peso secco, nonché da osservazioni qualitative di sintomi come clorosi, necrosi o deformazioni nella crescita.

5. Per quantificare gli effetti della sostanza chimica, si confronta la crescita nelle soluzioni di prova con quella delle piante di controllo e la concentrazione che causa una data percentuale di inibizione della crescita (per esempio 50 %), dove EC_x (ad esempio EC_{50}) "x" può corrispondere a qualsiasi valore prescritto dal quadro regolamentare, ad es. EC_{10} , EC_{20} ed EC_{50} . Va notato che le stime dei valori di EC_{10} ed EC_{20} sono affidabili e idonee solo nelle prove in cui i coefficienti di variazione per le piante di controllo sono inferiori al livello di effetto stimato, pertanto per un valore EC_{20} i coefficienti di variazione dovrebbero rimanere al di sotto del 20 %.
6. È opportuno determinare il tasso specifico di crescita medio (stimato in base alla lunghezza dei germogli, al peso fresco dei germogli e al peso secco degli stessi) e del rendimento (stimato in base alla crescita della lunghezza del germoglio principale, al peso fresco del germoglio e al suo peso secco) delle piante trattate e non trattate. Di conseguenza il tasso di crescita specifico (r — *rate*) e il rendimento (y — *yield*) sono usati per determinare, rispettivamente, il valore $E_r C_x$ (ad es. $E_r C_{10}$, $E_r C_{20}$, $E_r C_{50}$) e il valore $E_y C_x$ (ad es. $E_y C_{10}$, $E_y C_{20}$, $E_y C_{50}$).
7. Se necessario, la concentrazione minima a cui si osserva un effetto statisticamente significativo (LOEC) e la concentrazione senza effetti osservabili (NOEC) possono essere determinate mediante un calcolo statistico facendo riferimento a stime sui tassi di crescita specifici medi e sul rendimento.

INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA CHIMICA IN ESAME

8. Occorre disporre di un metodo analitico con un'adeguata sensibilità per la quantificazione delle sostanze chimiche nel mezzo di prova.
9. Le informazioni sulla sostanza chimica in esame che possono essere utili per stabilire le condizioni sperimentali comprendono la formula strutturale, la composizione in caso di sostanze multi-costitutive, le UVCB, le miscele o le formulazioni, la purezza, l'idrosolubilità, la stabilità in acqua e alla luce, la costante di dissociazione acida (pK_a), il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (K_{ow}), se possibile il K_d nei sedimenti, la pressione di vapore e la biodegradabilità. L'idrosolubilità e la pressione di vapore possono essere utilizzate per calcolare la costante di Henry, che indica se possono verificarsi perdite significative della sostanza chimica in esame nel corso della prova. Se è probabile che ci siano delle perdite di sostanze chimiche in esame, tali perdite vanno quantificate e vanno documentati i successivi accorgimenti per controllare tali perdite. Quando le informazioni sulla solubilità e la stabilità della sostanza chimica in esame non sono conosciute con certezza, si consiglia di verificarle nelle condizioni sperimentali, ossia nel mezzo di crescita, alla temperatura e con l'illuminazione che si utilizzeranno nella prova. *Nota:* quando la prova riguarda erbicidi con un'azione perossidante foto-indotta, l'illuminazione usata in laboratorio sarà regolata in modo tale da emettere raggi ultravioletti equivalenti a quelli della luce naturale del sole.
10. Il pH è misurato e regolato adeguatamente nel mezzo di prova. È particolarmente importante regolare il pH del mezzo di prova, ad es. quando si saggiano metalli o sostanze chimiche idroliticamente instabili. Un documento di orientamento OCSE (11) fornisce ulteriori orientamenti per saggiare sostanze chimiche le cui proprietà fisico-chimiche rendono difficile la conduzione delle prove.

VALIDITÀ DELLA PROVA

11. Affinché la prova risulti valida, la lunghezza media totale dei germogli e il peso fresco medio totale nelle piante di controllo devono almeno raddoppiare nel corso della fase di esposizione della prova. Inoltre, le piante di controllo non devono presentare nessun sintomo visibile di clorosi e non devono essere osservabili contaminazioni da parte di altri organismi, come pellicole di alghe e/o batteri sulle piante, sulla superficie del sedimento e nel mezzo di prova.
12. Nelle colture di controllo, il coefficiente di variazione medio del rendimento basato sulle misurazioni del peso fresco del germoglio (ossia tra l'inizio e la fine della prova) non deve superare il 35 % tra le varie repliche.

SOSTANZE CHIMICHE DI RIFERIMENTO

13. Una o più sostanze chimiche di riferimento, come per esempio il 3,5-diclorofenolo utilizzato nella prova interlaboratorio (9), vanno esaminate periodicamente al fine verificare i risultati della procedura di prova nel tempo. Sulla base dei risultati della prova interlaboratorio, i valori medi di EC_{50} del 3,5-diclorofenolo per le diverse variabili di risposta sono compresi tra 4,7 mg/l e 6,1 mg/l (per i dettagli sull'intervallo di confidenza anticipato associato a tali valori si rimanda alla relazione sulla prova interlaboratorio). Si consiglia di effettuare una prova con una sostanza chimica di riferimento almeno due volte l'anno o, qualora la prova sia realizzata con una frequenza irregolare, parallelamente alle prove di tossicità definitive. La relazione statistica della prova interlaboratorio internazionale (9) fornisce orientamenti relativi ai valori EC_{50} per il 3,5-diclorofenolo.

DESCRIZIONE DEL METODO

Apparecchiatura di prova

14. La prova dovrebbe essere svolta in condizioni ambientali controllate, ossia in una camera di crescita, in una stanza o in un laboratorio, con la possibilità di determinare la durata del giorno, dell'illuminazione e della temperatura (cfr. la sezione "condizioni di prova", paragrafi 56-58). Le colture madre vanno mantenute separate dai recipienti di prova.
15. Per lo studio si usano recipienti in vetro come acquari e becher. sono comunemente impiegati becher in vetro da 2 litri (circa 24 cm di altezza e 11 cm di diametro). Possono tuttavia essere impiegati altri recipienti (ad esempio più larghi), a condizione che ci sia una quantità sufficiente di acqua che consenta una crescita illimitata e una completa sommersione delle piante per l'intera durata della prova.
16. Per inserire le piante nel sedimento si può ricorrere a vasi di piante in plastica o in vetro (approssimativamente con un diametro di 9 cm, un'altezza di 8 cm e un volume di 500 ml). In alternativa si possono usare anche becher in vetro, una scelta preferibile in alcuni casi (ad esempio nei test su sostanze chimiche idrofobiche o con un elevato valore K_{ow}).
17. La scelta della dimensione del vaso/becher va considerata insieme alla scelta dei recipienti di prova e del disegno sperimentale (vedasi infra). Se si utilizza un disegno sperimentale di tipo A (un germoglio per vaso con tre vasi per recipiente), possono essere necessari vasi più piccoli o recipienti più grandi. Se si utilizza un disegno sperimentale di tipo B (tre germogli per vaso con un vaso per recipiente), le dimensioni dei vasi indicate dovrebbero essere adeguate. In ogni caso, la profondità minima dell'acqua in cui sono sommerse le piante dovrebbe essere di 12 cm superiore all'altezza del sedimento e va registrato il rapporto superficie/volume del sedimento e superficie/volume dell'acqua.

Organismo sperimentale

18. Gli approcci generali descritti nel presente metodo di prova possono essere utilizzati per testare una serie di specie vegetali acquatiche. Tuttavia, le condizioni descritte nel presente metodo di prova sono adeguate nello specifico alla *Myriophyllum spicatum*, della famiglia delle millefoglie d'acqua. Questa specie appartiene alla classe di dicotiledoni che fa parte della famiglia delle Aloragidacee.
19. Il *Myriophyllum spicatum* (millefoglio d'acqua comune) è una specie con radici sommerse, che sopravvive in una vasta gamma di condizioni e si trova in corpi d'acqua statici o correnti. Il *M. spicatum* è una pianta le cui radici sono l'unica parte che sopravvive in inverno. In generale queste piante fioriscono e producono semi liberamente, sebbene la propagazione vegetativa da gemme ascellari o frammenti del fusto che si staccano naturalmente o in seguito all'intervento di agenti esterni, sia spesso il principale metodo di colonizzazione.

Coltivazione dell'organismo di prova:

20. I vegetali possono essere ottenuti da popolazioni naturali o tramite fornitori di piante acquatiche. In entrambi i casi, va documentata la provenienza delle piante e verificata l'identità della specie. In occasione dei prelievi in natura, è necessario procedere con la massima cura per scegliere la specie desiderata, in particolare nelle regioni in cui sussiste il rischio di formazione di ibridi con altre specie di *Myriophyllum*. In caso di dubbio, si raccomanda di ricorrere a colture da laboratorio da fonti note. Le piante che sono state esposte a eventuali contaminanti chimici o raccolte da siti che risultano contaminati sono da escludere dal presente metodo di prova.
21. Nelle regioni in cui non è facile disporre di *M. spicatum* nei mesi invernali, può essere necessario ricorrere a un mantenimento a lungo termine di colture madre in serra o in condizioni di laboratorio. Le colture madre vanno mantenute a condizioni analoghe a quelle di prova, sebbene l'irradiazione e la temperatura possano essere ridotte al fine di diminuire la frequenza degli interventi di mantenimento della coltura (ad esempio, quando non sono previste prove su *Myriophyllum* per un dato periodo). Si raccomanda l'uso di acquari e vasi per piante più grandi di quelli impiegati nelle prove, al fine di fornire spazio per la proliferazione. La composizione del sedimento e del mezzo acquoso è identica a quella usata nella prova, sebbene possano essere utilizzati metodi alternativi di fertilizzazione del sedimento (formulazioni con fertilizzante commerciale a rilascio lento).

22. Le colture madre devono essere chiaramente esenti da contaminazioni di altri organismi, compresi lumache, alghe filamentose, funghi e insetti, ad esempio uova o larve della falena *Paraponyx stratiotata* e larve o esemplari adulti di *Eubrychius velutus*. Può essere necessario risciacquare il materiale vegetale con acqua dolce per rimuovere ogni contaminazione visibile. Dovrebbero inoltre essere compiuti sforzi per ridurre al minimo lo sviluppo di alghe unicellulari e la contaminazione batterica, sebbene non sia necessario che il materiale vegetale sia completamente sterile. Le colture madre vanno monitorate e travasate a seconda delle necessità per evitare lo sviluppo di contaminazioni da alghe e batteri. Nel caso in cui una contaminazione dovesse diventare problematica può essere utile aerare le colture madre.
23. In ogni caso le piante sono coltivate/acclimatate a condizioni simili, ma non identiche, a quelle usate nella prova, per un periodo adeguato (vale a dire > 2 settimane) prima del loro utilizzo in una prova.
24. Le colture madre che presentano infiorescenze vanno escluse dalle prove poiché la crescita vegetativa di norma cala nel corso e in seguito alla fioritura.

Sedimento

25. Per questo test si raccomanda di utilizzare il sedimento artificiale usato nel capitolo C.28 del presente allegato (8). Il sedimento è preparato come indicato nel metodo di prova C.28, eccezion fatta per l'aggiunta di sostanze nutritive come descritto di seguito:
 - a) 4-5 % di torba (peso secco, $2 \pm 0,5$ % di carbonio organico), con un pH che si avvicini il più possibile a un valore compreso tra 5,5 e 6,0; è importante utilizzare torba sotto forma di polvere, finemente macinata (granulometria preferibile ≤ 1 mm) ed essiccata unicamente all'aria;
 - b) 20 % (peso secco) di argilla caolinica (tenore di caolinite di preferenza superiore al 30 %);
 - c) 75-76 % (peso secco) di sabbia di quarzo (composta in prevalenza da sabbia fine, con oltre il 50 % delle particelle di granulometria compresa tra 50 e 200 μm);
 - d) è aggiunto un mezzo nutritivo acquoso per far sì che il sedimento finale contenga 200 mg/kg di sedimento secco sia di cloruro di ammonio, sia di fosfato di sodio e che il tenore di umidità della miscela finale si attesti tra il 30 % e il 50 %;
 - e) è aggiunto carbonato di calcio di qualità chimicamente pura (CaCO_3) per aggiustare il pH della miscela finale a $7,0 \pm 0,5$.
26. Il luogo di provenienza di torba, argilla caolinica e sabbia deve essere noto e documentato. Se l'origine è ignota o ci sono margini di incertezza, occorre verificare che i componenti del sedimento non siano contaminati da sostanze chimiche (ad esempio metalli pesanti, composti organoclorurati, composti organofosforici).
27. I componenti secchi del sedimento devono essere miscelati in maniera uniforme prima che la soluzione nutritiva acquosa sia miscelata in maniera omogenea nel sedimento. Il sedimento umido deve essere preparato almeno due giorni prima dell'uso, onde consentire che la torba sia completamente imbevuta ed evitare che le particelle idrofobe di torba flottino in superficie quando il sedimento viene coperto dal mezzo di prova; prima dell'uso il sedimento umido può essere conservato al buio.
28. Per la prova, il sedimento viene trasferito in contenitori di dimensioni adeguate, come vasi con un diametro che consenta di inserirli nei recipienti in vetro (la superficie del sedimento deve coprire circa il 70 % o più della superficie del recipiente). Nei casi in cui il contenitore presenti dei fori nella parte inferiore, un pezzo di carta da filtro nella parte inferiore del contenitore contribuirà a mantenere il sedimento all'interno dello stesso. I vasi sono riempiti con il sedimento in modo tale che la superficie del sedimento sia livellata, prima di procedere alla copertura con uno strato sottile (~ 2 a 3 mm) di materiale inerte come sabbia, ghiaia fine da giardino (o corallo frantumato) per mantenere un corretto posizionamento.

Mezzo di prova

29. Per la coltivazione e i test su *Myriophyllum spicatum* si raccomanda di usare il mezzo di prova di Smart e Barko (12). La preparazione di questo mezzo è riportata nell'appendice 1. Ai fini di una crescita ottimale delle piante, il pH del mezzo (fase acquatica) all'inizio della prova è compreso tra 7,5 e 8,0.

Disegno sperimentale

30. La prova deve comprendere un minimo di sei recipienti di prova per le repliche per il controllo non trattato e un minimo di quattro recipienti di prova per ciascuno degli almeno cinque livelli di concentrazione.
31. Se la determinazione della NOEC non è necessaria, la prova può essere modificata in modo da aumentare il numero di concentrazioni e ridurre il numero di repliche per concentrazione.
32. Ciascun recipiente di prova corrisponde a una replica che contiene tre germogli. Vi sono due opzioni per la coltivazione di tre germogli in ciascun recipiente di prova:
 - Disegno sperimentale di tipo A: un germoglio per vaso e tre vasi per recipiente.
 - Disegno sperimentale di tipo B: tre germogli per vaso e un vaso per recipiente.
 - Si possono accettare disegni sperimentali alternativi di un germoglio per vaso e per recipiente, a condizione che la replica sia adeguata, come richiesto, al conseguimento dei necessari criteri di validità.
33. I singoli recipienti di prova vanno assegnati a random ai gruppi di trattamento. La disposizione casuale dei recipienti di prova nell'area di prova è necessaria per ridurre al minimo l'impatto delle differenze spaziali di intensità di luce o di temperatura.

Concentrazioni della sostanza chimica in esame e gruppi di controllo

34. Di norma le concentrazioni devono seguire una serie geometrica; il fattore di separazione tra le concentrazioni non deve essere superiore a 3,2. Per determinare le concentrazioni sperimentali adeguate è utile conoscere già la tossicità della sostanza chimica in esame sulla base di precedenti prove a diversi intervalli di concentrazione.
35. Per determinare il valore EC_x , le concentrazioni di prova devono essere intorno al valore EC_x per garantire un intervallo di confidenza adeguato. Ad esempio, quando si valuta il valore EC_{50} , la concentrazione di prova più elevata deve essere superiore al valore EC_{50} . Se il valore EC_{50} si situa al di fuori dall'intervallo delle concentrazioni in esame i relativi intervalli di confidenza saranno ampi, il che rischia di impedire una valutazione corretta dell'adeguamento statistico del modello. L'utilizzo di un maggior numero di concentrazioni di prova migliorerà l'intervallo di confidenza attorno al valore EC_x .
36. Al fine di determinare la LOEC/NOEC (endpoint facoltativo), la concentrazione di prova più bassa deve essere sufficientemente contenuta da far sì che la crescita non sia notevolmente diversa da quella nelle piante di controllo. La concentrazione di prova più elevata deve invece essere sufficientemente alta da far sì che la stessa sia significativamente inferiore a quella del controllo. L'utilizzo di un maggior numero di repliche migliorerà la potenza statistica dell'approccio che si basa sulla concentrazione senza effetti e l'analisi della varianza.

Prova limite

37. Quando una prova preliminare indica che la sostanza chimica in esame non ha effetti tossici in concentrazioni fino a 100 mg/l oppure fino al suo limite di solubilità nel mezzo di prova o in caso di formulazione fino al limite della sua capacità di dispersione, può essere svolta una prova limite che consiste nel confrontare le risposte di un gruppo di controllo e di un gruppo trattato (a una concentrazione di 100 mg/l o pari al limite di solubilità oppure a 1 000 mg/kg di sedimento secco). Questa prova deve rispettare i principi generali di un test dose/risposta standard, ad eccezione del fatto che si raccomanda di aumentare il numero minimo di repliche a sei recipienti di prova per controllo e per concentrazione. La crescita nel gruppo di controllo e nel gruppo trattato può essere analizzata mediante una prova statistica che consenta di paragonare le medie, per esempio un t-test di Student.

Soluzioni di prova

38. Le soluzioni di prova sono generalmente create mediante diluizione di una soluzione madre, preparata sciogliendo o disperdendo la sostanza in esame in un mezzo di prova di Smart e Barko, usando acqua demineralizzata (distillata o deionizzata — cfr. appendice 1).

39. La concentrazione di prova massima non può di norma superare l'idrosolubilità della sostanza chimica in esame o, nel caso di formulazioni, la capacità di dispersione alle condizioni di prova.
40. Per le sostanze chimiche a bassa idrosolubilità potrà essere necessario preparare una soluzione madre concentrata o disperdere la sostanza chimica utilizzando un solvente o un disperdente organico, al fine di agevolare l'aggiunta di quantità esatte della sostanza chimica in esame nel mezzo di prova e favorirne la dispersione e la dissoluzione. Occorre fare il possibile per evitare di utilizzare tali solventi o disperdenti. I solventi o i disperdenti non devono indurre fitotossicità. Tra i solventi di uso comune che non provocano fitotossicità a concentrazioni fino a 100 µl/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 ≤ 100 µl/l). In tali circostanze, tutti i trattamenti e i controlli (solvente) devono contenere la stessa concentrazione di solvente o disperdente. Anche le repliche di controllo non trattate che non contengono un solvente o un disperdente sono incorporate nel disegno sperimentale. Ulteriori informazioni sull'uso dei disperdenti sono riportate nel relativo documento di orientamento OCSE (11).

PROCEDURA DI PROVA

41. La procedura di prova varia a seconda della via di applicazione della sostanza chimica in esame (fase acquatica o del sedimento). Il probabile comportamento della sostanza chimica in esame in un sistema acqua-sedimento deve essere preso in considerazione nella scelta del regime di esposizione usato nella prova (ossia statico o a ricambio statico, con acqua addizionata o sedimento addizionato). In alcuni casi può essere preferibile usare il sedimento addizionato per le prove relative a sostanze chimiche che si ripartiscono significativamente nel sedimento.

Fase di impianto

42. Sezionare apici/estremità di germogli sani, ossia senza germogli laterali, sono sezionati dalle piante della coltura per ottenere una lunghezza dei germogli di 6 cm (± 1 cm). Se si utilizza un disegno sperimentale di tipo A (un germoglio per vaso con tre vasi per recipiente), si impianta un'estremità di germoglio in ciascun vaso. Se si utilizza un disegno sperimentale di tipo B (tre germogli per vaso con un vaso per recipiente), si impiantano da quattro a cinque apici di germoglio in ciascun vaso contenente il sedimento.
43. In entrambi i casi i vasi in eccesso vanno comunque utilizzati al fine di consentire di selezionare piante uniformi a inizio prova e per garantire la presenza di piante di riserva da utilizzare per il controllo della crescita delle radici immediatamente prima del trattamento e piante di riserva da raccogliere per misurare la biomassa e la lunghezza del germoglio al giorno 0.
44. I germogli sono inseriti in modo da tenere circa tre cm, comprendenti almeno due nodi, al di sotto della superficie del sedimento.
45. I vasi sono in seguito trasferiti nei recipienti di prova alle stesse condizioni ambientali della fase di esposizione e mantenuti in un mezzo di prova di Smart e Barko per sette giorni al fine di indurre lo sviluppo delle radici.
46. Trascorso questo tempo, diverse piante nei vasi di riserva vanno rimosse ai fini del controllo della crescita delle radici. Se non è osservabile alcuna crescita delle radici (ossia non sono visibili le estremità delle radici), la fase di impianto va estesa fino a quando tale crescita non sarà riconoscibile. Si raccomanda di effettuare questo passaggio per garantire che le piante crescano attivamente al momento dell'inizio della prova.

Selezione di materiale vegetale uniforme

47. Se si utilizza un disegno sperimentale di tipo A (un germoglio per vaso con tre vasi per recipiente), prima dell'inizio della prova i vasi sono selezionati in funzione della loro uniformità. Se si utilizza un disegno sperimentale di tipo B (tre germogli per vaso con un vaso per recipiente), le piante in eccesso sono rimosse al fine di tenere tre piante uniformi in termini di dimensioni e aspetto.

Esposizione tramite la fase acquatica

48. Le estremità, selezionate con criterio di uniformità, sono inserite nei recipienti di prova come richiesto dal disegno sperimentale. In seguito si aggiunge ai recipienti il mezzo di prova di Smart e Barko. Si avrà cura di arrecare la minor perturbazione possibile al sedimento. A tal fine, si può aggiungere un mezzo con un imbuto o un disco di plastica per coprire il sedimento mentre viene versato nei recipienti di prova, a condizione che il disco sia rimosso subito dopo. In alternativa, i vasi che contengono le piante possono essere inseriti nei recipienti di prova dopo l'aggiunta del mezzo. In entrambi i casi, si può usare un mezzo nuovo all'inizio della fase di esposizione, se necessario per ridurre al minimo il possibile accumulo di alghe e batteri o per consentire la preparazione dei singoli lotti di soluzione di prova nelle varie repliche.
49. La lunghezza del germoglio che spunta oltre il sedimento è misurata prima o dopo l'aggiunta del mezzo.
50. La quantità pertinente di sostanza chimica in esame può essere aggiunta al mezzo di prova prima che questo sia inserito nei recipienti di prova. In alternativa, la sostanza chimica in esame può essere introdotta nel mezzo di prova dopo che quest'ultimo sarà inserito nei recipienti di prova. In questo caso è necessario accertarsi che la sostanza chimica in esame sia perfettamente e omogeneamente distribuita nel sistema di prova senza perturbazione del sedimento.
51. In ogni caso l'aspetto (per esempio chiaro, torbido, ecc.) del mezzo di prova è registrato a inizio prova.

Esposizione tramite il sedimento

52. I sedimenti addizionati, alla concentrazione desiderata, vengono preparati aggiungendo una soluzione della sostanza chimica in esame direttamente al sedimento nuovo. La soluzione madre della sostanza chimica in esame disciolta in acqua deionizzata viene mescolata con il sedimento artificiale mediante un laminatoio, un miscelatore per mangimi oppure a mano. Se scarsamente solubile in acqua, la sostanza chimica in esame può essere disciolta nel minor volume possibile di un solvente organico idoneo (per esempio esano, acetone, cloroformio). La soluzione ottenuta va poi mischiata con circa 10 g di sabbia quarzosa fine per ciascun recipiente di prova. Il solvente viene fatto evaporare e la sabbia va poi mescolata alla quantità di sedimento idonea tramite becher di prova. Per solubilizzare, disperdere o emulsionare la sostanza chimica in esame, si possono impiegare soltanto agenti che volatilizzano rapidamente. Occorre tener conto che il rapporto volume/peso della sabbia cui è stata aggiunta la sostanza chimica in esame va considerato nella preparazione finale del sedimento (ossia, il sedimento va quindi preparato utilizzando meno sabbia). Occorre fare attenzione affinché la sostanza chimica in esame aggiunta al sedimento sia perfettamente e omogeneamente distribuita al suo interno.
53. Il sedimento addizionato viene introdotto nei vasi (come descritto sopra). Le piante, selezionate con criterio di uniformità e con un adeguato sistema di radici, sono rimosse dai vasi usati nella fase di impianto e trapiantate nel sedimento addizionato come descritto sopra.
54. I vasi sono inseriti nei recipienti di prova come richiesto dal disegno sperimentale. Il mezzo di prova di Smart e Barko è in seguito aggiunto accuratamente (ossia utilizzando un imbuto), al fine di evitare perturbazioni del sedimento. La lunghezza del germoglio che spunta oltre il sedimento è misurata prima o dopo l'aggiunta del mezzo.

Mantenimento del livello dell'acqua nel corso della prova

55. Il volume finale di acqua deve essere registrato e il livello dell'acqua va segnato su ciascun recipiente di prova. Se l'acqua evapora durante la prova in una misura superiore al 10 %, il livello dell'acqua deve essere regolato con acqua distillata. Se necessario, i becher possono essere coperti in maniera non ermetica da un involucro trasparente, ad esempio da coperchi di plastica, per minimizzare l'evaporazione e la contaminazione con spore di alghe.

Condizioni di prova

56. Occorre fornire un'illuminazione a fluorescenza bianca, calda o fredda, al fine di ottenere un'intensità luminosa di circa $140 (\pm 20) \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, misurata in una radiazione fotosinteticamente attiva (400-700 nm) alla superficie dell'acqua, e con un ciclo luce-buio di 16:8 ore. L'irradiazione di luce misurata alla superficie dell'area di prova non può scostarsi di oltre $\pm 15 \%$ dai valori scelti.

57. La temperatura nei recipienti di prova è essere mantenuta a 20 (\pm 2) °C.
58. Il pH del mezzo di controllo non deve aumentare di oltre 1,5 unità nel corso della prova. Uno scarto superiore a 1,5 unità non invalida la prova se il rispetto dei criteri di validità specificati in precedenza può essere dimostrato.

Durata della prova

59. La durata di esposizione è di 14 giorni.

Misure e determinazioni analitiche

60. Dopo la fase di impianto e immediatamente prima del trattamento (ossia al giorno 0), vengono raccolte, ai fini di valutazione della lunghezza del germoglio e del peso fresco e secco come descritto di seguito, le piante di riserva provenienti da cinque vasi scelti a caso (per il disegno sperimentale che prevede tre piante per vaso) oppure 15 vasi (per il disegno sperimentale che prevede una pianta per vaso).
61. Per le piante immerse nella fase di esposizione, si eseguono le seguenti valutazioni come indicato nella tabella 1:
- le valutazioni relative alla lunghezza del germoglio principale e al numero e alla lunghezza dei germogli laterali sono registrate almeno alla fine del periodo di esposizione (ad esempio al giorno 14);
 - le valutazioni visive della salute delle piante sono registrate almeno tre volte durante il periodo di esposizione (ad esempio al giorno 0, 7 e 14);
 - le valutazioni del peso fresco e del peso secco dei germogli sono effettuate a fine prova (ad esempio al giorno 14).
62. La lunghezza dei germogli è misurata con un righello. Se sono presenti germogli laterali, vanno contati e va misurata la loro lunghezza.
63. Le valutazioni visive della salute delle piante sono effettuate tramite la registrazione dell'aspetto delle piante e dello stato generale del mezzo di prova. Le osservazioni di cui prendere nota riguardano:
- necrosi, clorosi e altre decolorazioni come eccessivo arrossamento rispetto alle piante di controllo.
 - Sviluppo di batteri o contaminazione da alghe;
 - Anomalie della crescita, ad esempio ritardi nella crescita, alterazione dell'intervallo tra i due nodi, malformazioni dei germogli/delle foglie, proliferazione di germogli laterali, perdita di foglie, abbassamento del turgore e frammentazione del fusto.
 - Le valutazioni visive dello stato di salute delle radici si svolgono a fine prova, lavando accuratamente le radici per rimuovere il sedimento per consentire l'osservazione dell'apparato radicale. Segue una proposta di scala di valutazione relativa alle piante di controllo:
 - 1) assenza di radici
 - 2) poche radici
 - 3) sviluppo moderato delle radici
 - 4) sviluppo molto buono delle radici, analogo a quello delle piante di controllo
64. Le valutazioni di peso fresco vengono effettuate a inizio e fine prova tagliando il germoglio al livello del sedimento e asciugandolo in carta assorbente prima della pesata. Occorre prestare attenzione a rimuovere le particelle di sedimento che potrebbero aver aderito alla base del germoglio. I germogli sono in seguito inseriti in un forno di essiccazione a circa 60°C e asciugati a peso costante, prima della nuova misurazione del peso che consente di rilevare il peso secco.
65. La tabella 1 fornisce una sintesi delle valutazioni biologiche minime richieste durante la durata della prova.

Tabella 1

Protocollo di valutazione

Giorno dopo il trattamento (DBP)	<i>Myriophyllum spicatum</i>			
	Lunghezza del germoglio, numero e lunghezza dei germogli laterali	Valutazione visiva dei germogli	Peso fresco e secco del germoglio Valutazione visiva delle radici	pH O ₂
0	V	V	V	V
4	-	—	—	—
7	-	V	—	V
14	V	V	V	V

V: indica che in questi casi sono richieste misurazioni

—: indica che non sono richieste misurazioni

Frequenza delle misurazioni e determinazioni analitiche

66. La temperatura del mezzo è misurata almeno una volta al giorno in un recipiente di prova supplementare conservato nelle stesse condizioni degli altri nella stanza di crescita, l'incubatore o la stanza.
67. Il pH e la concentrazione dell'ossigeno disciolto del mezzo di prova devono essere controllati a inizio prova, almeno una volta nel corso della prova e a fine prova in tutte le repliche. In ciascun caso, le misurazioni devono essere effettuate nella stessa ora del giorno. Se per la preparazione di tutte le repliche di ogni concentrazione di prova è usata un'unica soluzione per recipiente (*bulk solution*), è ammesso procedere a un'unica misurazione di ciascuna soluzione al giorno 0.
68. L'irradiazione è misurata nella camera di crescita, nell'incubatore o nella stanza in punti situati allo stesso livello della superficie dell'acqua. Tali misurazioni devono essere effettuate almeno una volta a inizio prova o durante la prova. Il metodo di individuazione e misurazione della luce, in particolare il tipo di sensore, inciderà sul valore misurato. I sensori sferici (che rilevano la luce proveniente da tutti gli angoli situati sopra e sotto il piano di misurazione) e i sensori "cosinusoidali" (che rilevano la luce da tutti gli angoli situati al di sopra del piano di misurazione) sono preferibili ai sensori unidirezionali e indicheranno valori più elevati per una fonte luminosa multipla come quella qui descritta.

Misurazioni analitiche della sostanza chimica in esame

69. La corretta applicazione della sostanza chimica in esame va scelta in base alle misurazioni analitiche delle concentrazioni della sostanza chimica in esame.
70. I campioni di acqua sono raccolti ai fini dell'analisi della sostanza chimica in esame poco dopo l'inizio della prova (vale a dire il giorno dell'applicazione per sostanze chimiche in esame stabili o un'ora dopo l'applicazione per sostanze chimiche in esame non stabili) e al termine della prova per tutte le concentrazioni di prova.
71. Le concentrazioni nel sedimento e nell'acqua interstiziale del sedimento sono determinate a inizio e fine prova, almeno alla concentrazione più elevata, a meno che non sia noto che le sostanze chimiche in esame sono stabili nell'acqua (> 80 % del valore nominale). Non è necessario analizzare il sedimento e l'acqua interstiziale se la ripartizione della sostanza chimica in esame tra l'acqua e il sedimento è stata chiaramente determinata con uno studio acqua/sedimento condotto in condizioni analoghe (ad esempio, rapporto sedimento/acqua, metodo di applicazione, tipo di sedimento).

72. Il prelievo di campioni di sedimento a inizio prova può perturbare l'impianto sperimentale. Di conseguenza, può essere necessario disporre di ulteriori recipienti di prova trattati per agevolare le determinazioni analitiche a inizio e fine prova. Analogamente, ove sia ritenuto necessario effettuare valutazioni intermedie, ossia al giorno 7, e le analisi richiedano numerosi campioni di sedimento che non possono essere facilmente rimossi dal sistema, occorre che le determinazioni analitiche siano svolte utilizzando recipienti di prova supplementari trattati allo stesso modo di quelli usati per le valutazioni biologiche.
73. Per isolare l'acqua interstiziale si raccomanda una centrifugazione, ad esempio a 10 000 g e a 4 °C per 30 minuti. Se però è dimostrato che la sostanza chimica in esame non adsorbe sui filtri, è accettabile anche la filtrazione. In alcuni casi, se i campioni sono troppo piccoli, può rivelarsi impossibile analizzare le concentrazioni nell'acqua interstiziale.
74. Nelle prove semistatiche (in cui l'esposizione avviene attraverso la fase acquatica) in cui non si prevede che la concentrazione della o delle sostanze chimiche in esame rimanga entro il 20 % della concentrazione nominale nel corso della prova senza rinnovo delle soluzioni di prova, a ciascun rinnovo è necessario campionare le soluzioni di prova usate e appena preparate ai fini dell'analisi della concentrazione della sostanza chimica in esame.
75. Nei casi in cui la concentrazione della sostanza chimica in esame misurata inizialmente non si situa entro il 20 % del valore nominale, ma in cui un numero sufficiente di indizi dimostra che le concentrazioni iniziali sono ripetibili e stabili (ossia nell'intervallo tra 80 % e il 120 % della concentrazione iniziale), le determinazioni chimiche possono limitarsi solo alla concentrazione di prova più alta e a quella più bassa.
76. In tutti i casi la determinazione delle concentrazioni della sostanza chimica in esame può limitarsi ad un unico recipiente per ciascuna concentrazione. In alternativa, le soluzioni di prova di tutte le repliche di ciascuna concentrazione possono essere riunite per l'analisi.
77. Se è comprovato che la concentrazione della sostanza chimica in esame si è mantenuta nel corso dell'intera prova entro il 20 % della concentrazione nominale o della concentrazione misurata all'inizio, l'analisi dei risultati e le conseguenze sugli effetti studiati possono basarsi sui valori nominali o sui valori misurati all'inizio.
78. In questi casi, le concentrazioni che determinano un effetto sono basate su misurazioni nominali o misurate delle concentrazioni nell'acqua a inizio prova.
79. Tuttavia, in presenza di un calo comprovato della concentrazione (ossia nel caso in cui il valore non è rimasto entro il 20 % della concentrazione iniziale nominale o misurata nel comparto trattato) nel corso della prova, l'analisi dei risultati è basata sulla media geometrica della concentrazione durante l'esposizione o su modelli che descrivono la contrazione della concentrazione della sostanza chimica in esame nel comparto trattato (11).

VALUTAZIONE DEI DATI

80. Nei casi in cui è richiesto l'uso di un solvente/disperdente, è possibile raggruppare i dati relativi al solvente e ai controlli non trattati ai fini di analisi statistiche, a condizione che le risposte del solvente e dei controlli non trattati non siano diversi sul piano statistico.

Variabili di risposta

81. La finalità di questa prova è di determinare gli effetti della sostanza chimica in esame sulla crescita vegetativa della specie sperimentale, usando due variabili di risposta, il tasso di crescita specifico medio e il rendimento, come segue:

Tasso di crescita specifico medio

82. Questa variabile di risposta è basata sulle variazioni, nel tempo, dei valori logaritmici della lunghezza totale dei germogli, del peso fresco totale dei germogli e del peso secco totale dei germogli, nei controlli e in ciascun gruppo di trattamento. Questa variabile è calcolata per ogni replica di ciascun gruppo di trattamento e di controllo. La lunghezza media e il peso medio delle tre piante per recipiente di prova (replica) e, successivamente, il tasso di crescita per ogni replica, vanno calcolati con la seguente formula:

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

laddove:

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

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

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

t: periodo di tempo tra i e j

83. In base alle risposte delle repliche, per ogni gruppo di trattamento e di controllo si calcola un valore medio di tasso di crescita con stime della varianza.
84. Occorre calcolare il tasso di crescita specifico medio per l'intero periodo di prova (il momento "i" citato nella formula corrisponde all'inizio della prova e il momento "j" corrisponde alla fine della prova). Per ciascuna concentrazione dei gruppi trattati e di controllo, calcolare il valore medio del tasso di crescita specifico medio e le stime della varianza.
85. La percentuale di inibizione del tasso di crescita (I_r) può essere successivamente calcolata per ciascuna concentrazione di prova (gruppo trattato) secondo la formula seguente:

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

laddove:

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

μ_c : valore medio di μ nel gruppo di controllo

μ_T : valore medio di μ nel gruppo trattato

Rendimento

86. Questa variabile di risposta è basata sulle variazioni, nel tempo, della lunghezza totale dei germogli, del peso fresco totale dei germogli e del peso secco totale dei germogli, nei controlli e in ciascun gruppo di trattamento. Per ogni gruppo trattato la percentuale media di inibizione del rendimento ($\% I_y$) può essere calcolata secondo la formula seguente:

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

laddove:

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

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

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

Tracciato delle curve concentrazione-risposta

87. Occorre tracciare curve concentrazione-risposta che raffigurino la percentuale d'inibizione media della variabile di risposta (I_r oppure I_y calcolate come indicato qui sopra) e il logaritmo della concentrazione della sostanza chimica in esame.

Stima del valore EC_x

88. Le stime del valore EC_x (ad es. EC_{50}) devono basarsi sia sul tasso di crescita specifico medio ($E_r C_x$), sia sul rendimento ($E_y C_x$), e ciascuna di queste variabili in esame deve essere a sua volta basata sul peso fresco totale dei germogli, sul peso secco totale dei germogli e sulla lunghezza totale dei germogli.
89. Occorre rilevare che i valori di EC_x calcolati utilizzando queste due variabili di risposta non sono comparabili e che occorre tenere conto di questa differenza quando si utilizzano i risultati della prova. I valori 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, per via del fondamento matematico dei due approcci. Questa differenza è dovuta solo al calcolo matematico e non va interpretata come una differenza di sensibilità tra le due variabili in esame.

Procedure statistiche

90. L'obiettivo è ottenere una relazione quantitativa concentrazione-risposta mediante un'analisi della regressione. È possibile utilizzare una regressione lineare ponderata, preceduta da una trasformazione linearizzante dei dati di risposta — per esempio in unità probit, logit o Weibull (13) —, ma è preferibile applicare metodi di regressione non lineare in quanto tengono conto meglio delle inevitabili irregolarità dei dati e degli scarti rispetto alle distribuzioni regolari. Vicine allo zero o all'inibizione totale, queste irregolarità possono essere amplificate dalla trasformazione e interferire con l'analisi (13). Si fa presente che i metodi analitici standard che utilizzano le trasformazioni probit, logit, o Weibull si applicano a dati quantali (per esempio, mortalità o sopravvivenza) e devono quindi essere modificati per poter essere utilizzati con i dati relativi alla crescita o al rendimento. Per le procedure che consentono di determinare i valori di EC_x a partire da dati continui si vedano i riferimenti (14) (15) (16) (17).
91. Per ciascuna variabile di risposta da analizzare, occorre utilizzare il rapporto concentrazione-risposta per calcolare stime puntuali dei valori EC_x . Gli intervalli di confidenza a 95 % sono determinati per ogni stima e la validità dei dati che descrivono gli effetti rispetto al modello di regressione è valutata graficamente o statisticamente. L'analisi della regressione deve essere effettuata basandosi sulle reazioni rilevate in ogni recipiente replicato e non sulle medie dei gruppi trattati.
92. Le stime di EC_{50} e gli intervalli di confidenza possono essere ottenuti anche mediante interpolazione lineare con *bootstrapping* (18), se i modelli o i metodi di regressione disponibili non sono adatti ai dati.
93. Per stimare la LOEC, e dunque la NOEC, è necessario paragonare le medie dei gruppi trattati mediante un'analisi della varianza (ANOVA). La media di ogni concentrazione è poi confrontata con la media dei controlli mediante un metodo adeguato (ad es. con i test di Dunnett, Williams) (19) (20) (21) (22). È necessario controllare se l'ipotesi di distribuzione normale e di omogeneità della varianza dell'ANOVA è fondata. Tale valutazione dovrebbe essere effettuata con un test di Shapiro-Wilks (per la distribuzione normale) o di Levene (per l'analisi della varianza). Se l'ipotesi della distribuzione normale e dell'omogeneità della varianza non si conferma, a volte si possono correggere i dati mediante una trasformazione logaritmica. Se l'eterogeneità della varianza e/o la deviazione dalla distribuzione normale è estrema e non può essere corretta mediante una trasformazione, si prenderanno in considerazione metodi di come, ad esempio, il test-t di Bonferroni-Welch, il test di tendenza regressiva di Jonkheere Terpstra e il test della mediana di Bonferroni. Ulteriori riferimenti sulla determinazione della NOEC sono reperibili al riferimento 16.

RELAZIONI

94. La relazione della prova deve comprendere le seguenti informazioni dettagliate:

Sostanza chimica in esame

Sostanza mono-costituente

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

- identificazione chimica, come la denominazione IUPAC o CAS, il numero CAS, il codice SMILES o InChI, la formula strutturale, l'identità chimica o impurità, se del caso e se le condizioni pratiche lo consentono, ecc.

Sostanza multi-costituente, UVCB e miscele:

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

Specie in esame

- nome scientifico e fonte.

Condizioni di prova

- durata e condizioni della fase di impianto;
- procedura sperimentale utilizzata (statica, semistatica o a impulsi);
- data di inizio e durata della prova,
- mezzo di prova, vale a dire il sedimento e il mezzo nutritivo liquido;
- descrizione del disegno sperimentale: camera/stanza di crescita o laboratorio, recipienti di prova e coperchi, volumi delle soluzioni, lunghezza e peso delle piante sperimentali per recipiente di prova a inizio prova, rapporto tra superficie del sedimento e superficie dell'acqua, rapporto tra volume del sedimento e volume dell'acqua;
- concentrazioni di prova (nominali e misurate, in funzione delle esigenze), numero di repliche per concentrazione;
- metodi di preparazione delle soluzioni madre e delle soluzioni di prova, ivi compreso l'uso di eventuali solventi o disperdenti;
- temperatura nel corso della prova;
- sorgente di luce, intensità luminosa ($\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$);
- valori del pH dei mezzi di prova e di controllo, nonché aspetto dei mezzi di prova all'inizio e alla fine della stessa;
- concentrazioni di ossigeno;
- metodo di analisi e dati adeguati per la valutazione della qualità (studi di convalida, scarti tipo o intervalli di confidenza delle analisi);
- metodi per la determinazione delle variabili di misurazione, ad esempio lunghezza, peso secco, peso fresco;
- tutte le differenze rispetto al presente metodo di prova.

Risultati

- dati grezzi: lunghezza e peso del germoglio principale delle piante/all'interno del vaso e altre variabili di misurazione in ciascun recipiente di prova e di controllo per ciascuna osservazione e analisi, conformemente al protocollo di valutazione di cui alla tabella 1;
- medie e scarti tipo per ciascuna variabile di misurazione;
- curve di crescita per ciascuna concentrazione;
- tempio di raddoppio/tasso di crescita dei controlli in base alla lunghezza dei germogli e al peso fresco, compreso il coefficiente di varianza del rendimento del peso fresco;
- calcolo delle variabili di risposta per ciascuna replica trattata, con valore medio e coefficiente di variazione delle repliche;
- rappresentazione grafica della relazione concentrazione/effetto;
- stime degli endpoint tossici per le variabili di risposta: ad esempio EC_{50} , e relativi intervalli di confidenza. Se calcolate, la LOEC e/o la NOEC e i metodi statistici utilizzati per determinarle;

- se è stata praticato un test ANOVA, la portata dell'effetto individuabile (per esempio, la differenza meno significativa);
- eventuali stimoli della crescita osservati in qualsiasi gruppo trattato;
- eventuali segni di fitotossicità e osservazioni delle soluzioni di prova;
- discussione dei risultati, comprese le eventuali ripercussioni sui risultati dovute allo scostamento dal presente metodo di prova.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Capitolo C.26 del presente allegato, *Prova di inibizione della crescita di specie di Lemna*.
- (2) Capitolo C.3 del presente allegato, *Alghe di acqua dolce e cianobatteri, prova di inibizione della crescita*.
- (3) Maltby, L. et al. (2010), *Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008*.
- (4) Arts, G.H.P. et al. (2008), *Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, pp. 199-206*.
- (5) ISO 16191:2013 *Water quality — Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of Myriophyllum aquaticum*.
- (6) Knauer, K. et al. (2006), *Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, Vol. 62/8, pp. 715-722*.
- (7) Capitolo B.50 del presente allegato, *Prova di tossicità sul Myriophyllum spicatum in un sistema di prova senza sedimento*.
- (8) Capitolo B.28 del presente allegato, *Prova di tossicità su chironomidi in sedimento-acqua con acqua addizionata*
- (9) Ratte, M., H. Ratte (2014), "Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using M. aquaticum and M. spicatum grown in a water-sediment system", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris.
- (10) Davies, J. et al. (2003), *Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron — a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, pp. 231 — 237*.
- (11) OCSE (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO (2000)6, OECD, Paris*.
- (12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), *Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, Vol. 21/3, pp. 251-263*.
- (13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), *Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, Vol. 18/9, pp. 713-718*.
- (14) Nyholm, N. et al. (1992), *Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/2, pp. 157-167*.
- (15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), *A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/10, 1485-1494*.
- (16) OCSE (2006), "Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.
- (17) Brain, P., R. Cousens (1989), *An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, Vol. 29/2, pp/93-96*.

-
- (18) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
- (19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.
- (20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.
- (21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.
- (22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.
-

Appendice 1

COMPOSIZIONE DEL MEZZO DI PROVA DI SMART E BARKO

Componente	Quantitativo di reagente aggiunto all'acqua (*) (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	91,7
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	69,0
NaHCO_3	58,4
KHCO_3	15,4
pH (equilibrio atmosferico)	7,9

(*) acqua demineralizzata (vale a dire distillata o deionizzata)

Appendice 2

DEFINIZIONI

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

Sostanza chimica: una sostanza o una miscela.

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

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

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

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

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

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

Monocultura: coltura con una sola specie vegetale.

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

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

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

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

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

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.
