

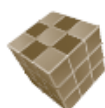


RAPPORTI ISTISAN 14|28

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Classificazione dei rifiuti: test richiesti dalla normativa

A cura di
L. Turco e R. Giovannangeli



AMBIENTE
E SALUTE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Classificazione dei rifiuti:
test richiesti dalla normativa**

A cura di
Laura Turco e Rosella Giovannangeli
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Rapporti ISTISAN
14/28

Istituto Superiore di Sanità

Classificazione dei rifiuti: test richiesti dalla normativa.

A cura di Laura Turco e Rosella Giovannangeli

2014, 50 p. Rapporti ISTISAN 14/28

Il DL.vo n. 205 del 3 dicembre 2010 che recepisce la Direttiva europea 2008/98/CE apporta alcune modifiche rispetto alla pregressa normativa in tema di classificazione dei rifiuti. Le novità salienti si riferiscono all'introduzione della caratteristica di pericolo "sensibilizzante" nonché a maggiori valutazioni e caratterizzazioni del rifiuto per la caratteristica di "eco-tossico". Vengono inoltre meglio definiti i limiti di concentrazione dei componenti del rifiuto allo scopo di classificare lo stesso come "pericoloso". Altra novità introdotta dalla nuova legge è la specifica e univoca indicazione dei metodi di prova necessari alla caratterizzazione del rifiuto dal punto di vista della sua pericolosità. Si sancisce lo stretto legame tra la normativa relativa alla classificazione delle sostanze e preparati pericolosi e quella relativa ai rifiuti rendendo assimilabile al concetto di rifiuto quello di una miscela di componenti non noti come identità chimica, ma noti nei loro possibili effetti additivi/sinergici sulla salute umana.

Parole chiave: Classificazione rifiuti, Direttiva 2008/98/CE; Italia

Istituto Superiore di Sanità

Classification of waste: tests requested by the current regulation.

Edited by Laura Turco and Rosella Giovannangeli

2014, 50 p. Rapporti ISTISAN 14/28 (in Italian)

The European Directive 98/2008/EC has been acknowledged in Italy by the legislative decree 205/2010. The new law introduces the voice "sensitizer" as hazard class in the classification applicable to waste materials and defines the hazard class "eco-toxic" in a more detailed characterization compared with the previous regulations in the field of waste management. Moreover the limit of concentrations for all the waste components in relation to their specific hazard classification has been defined in order to classify the hazard outcome. The methods required to define the toxicological features of the waste, when its composition is not completely known, have been stated. This law is based on the identification of the waste as a mixture of dangerous components, with possible additive/synergistic toxic effects on human health; thus there is a frequent referring to the regulation on chemicals and mixtures.

Key words: Classification of waste, Directive 98/2008/EC; Italy

Per informazioni su questo documento scrivere a: laura.turco@iss.it e rosella.giovannangeli@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Turco L, Giovannangeli R (Ed.). *Classificazione dei rifiuti: test richiesti dalla normativa*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2014. (Rapporti ISTISAN 14/28).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.



INDICE

Introduzione alla problematica della classificazione dei rifiuti

Loredana Musmeci 1

Classificazione dei rifiuti per la caratteristica H14 “Ecotossico” nei nuovi risvolti normativi (Legge 28/2012)

Federica Tommasi 6

Classificazione dei rifiuti: linee guida OECD e buona pratica di laboratorio

Emanuela Testai 22

Metodi *in vitro* richiesti per la classificazione H4 e H8 dei rifiuti

Laura Turco 30

Test richiesti per la classificazione ecotossicologica

Silvia Marchini 39

INTRODUZIONE ALLA PROBLEMATICAZIONE DELLA CLASSIFICAZIONE DEI RIFIUTI

Loredana Musmeci

Dipartimento Ambiente e connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Premessa

Le novità in tema di classificazione determinate dal recepimento della Direttiva 2008/98/CE (nota come Direttiva Quadro sui Rifiuti), avvenuto con il DL.vo n. 205 del 3 dicembre 2010, sono molteplici e possono essere in estrema sintesi così riassunte:

- introduzione di una caratteristica di pericolo: “sensibilizzanti”, che prende il posto della “vecchia” H13, a quest’ultima viene di conseguenza attribuita la nuova sigla H15;
- chiaro ed esplicito riferimento delle norme vigenti in tema di classificazione delle sostanze e dei preparati (miscele) pericolosi anche per la caratteristica di pericolo “ecotossico”;
- chiaro ed esplicito riferimento ai limiti di concentrazione previsti dalle norme inerenti la classificazione delle sostanze e preparati pericolosi ai fini della classificazione dei rifiuti come “pericolosi”;
- chiaro ed esplicito riferimento per la classificazione dei rifiuti pericolosi anche ai metodi adottati nell’ambito della disciplina sulle sostanze e preparati pericolosi.

L’individuazione dei rifiuti pericolosi riveste sempre una notevole importanza, in quanto, oltre agli aspetti di valutazione del rischio ambientale e sanitario, come noto, le sanzioni previste per una non corretta gestione degli stessi, sono ben diverse da quelle previste per i rifiuti non pericolosi. Nel DL.vo 205/2010, atto di recepimento della nuova Direttiva 2008/98/CE, viene riportata la seguente definizione di rifiuto pericoloso:

“rifiuto pericoloso: rifiuto che presenta una o più caratteristiche di cui all’allegato I della parte quarta del presente decreto”.

La definizione viene ribadita all’articolo 184, comma 4):

“sono rifiuti pericolosi quelli che recano le caratteristiche di pericolo di cui l’allegato I della Parte quarta del presente decreto”.

Entrambe le dizioni sono perfettamente coerenti con quelle della Direttiva 2008/98/CE.

Viene così superata l’espressione “si ritiene” della precedente versione che contrastava ampiamente con la stesura originale della Direttiva 91/689/CE (“Tali rifiuti devono possedere almeno una delle caratteristiche elencate nell’allegato III”).

Attualmente a livello comunitario è in corso di revisione sia la Direttiva 2008/98/CE e sia il catalogo dei rifiuti, in tale revisione verranno anche fornite precise indicazioni operative e procedure volte alla classificazione dei rifiuti; infatti verranno riportate nuove e più dettagliate definizioni delle varie caratteristiche di pericolo utilizzate per la classificazione dei rifiuti e, ove occorra, verranno anche indicati i valori limite di riferimento per le varie sostanze classificate.

Tuttavia nel DL.vo 205/2010 viene affermato che:

- articolo 184, comma I, e): “Con decreto del Ministero dell’ambiente e della tutela del territorio e del mare, da emanare entro centottanta giorni dall’entrata in vigore della presente disposizione, possono essere emanate specifiche linee guida per agevolare l’applicazione dei rifiuti introdotta agli allegati D e I del presente decreto”;
- articolo 195, f): “la definizione dei metodi, delle procedure e degli standard per il campionamento e l’analisi dei rifiuti” cioè predisposizione di linee guida per l’individuazione delle procedure analitiche, dei criteri e delle metodologie per la classificazione dei rifiuti pericolosi ai sensi dell’allegato D della quarta del presente decreto”.

Allo stato attuale non risulta che detto decreto del Ministero dell’Ambiente venga emanato, in quanto si attende la revisione della Direttiva 98/2008/CE.

Novità introdotte con il DL.vo 205/2010

Nell’allegato D, che riporta il catalogo europeo dei rifiuti (“Elenco dei rifiuti istituito dalla Decisione della Commissione 2000/532/CE del 3 maggio 2000”), nella parte introduttiva, al punto 5, relativo ai “codici a specchio”, viene riportato:

“Se un rifiuto è identificato come pericoloso mediante riferimento specifico o generico a sostanze pericolose, esso è classificato come pericoloso solo se le sostanze raggiungono determinate concentrazioni ad esempio, percentuale in peso, tali da conferire al rifiuto in questione una o più proprietà di cui all’allegato I”.

Tale definizione è perfettamente coerente con quelle di rifiuto pericoloso riportate nella Direttiva 2008/98/CE.

Nel DL.vo 205/2010 non è più presente la frase in cui si asseriva la mancanza di riferimenti per H1, H2, H9, H12, H13, H14, e quindi, a parte per la caratteristica H9, dette caratteristiche di pericolo non andavano applicate, mancando il riferimento comunitario. Ciò aveva messo l’Italia in una situazione difforme da tutti gli altri Stati Membri, che invece applicavano tutte le caratteristiche di pericolo riportate nella direttiva e in special modo applicavano la caratteristica H14 “Ecotossico” molto appropriata per i rifiuti, fornendo criteri e linee guida a livello nazionale (Regno Unito, Germania, Austria, Danimarca, ecc.).

L’applicazione ora obbligatoria della caratteristica di pericolo H14 ha ingenerato a livello nazionale molte polemiche e incertezze applicative, che hanno portato l’Istituto Superiore di Sanità e l’Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale ad emanare un parere congiunto recante i criteri tecnici di riferimento al fine di applicare ai rifiuti in modo coerente i principi del Regolamento (CE) 1272/2008 sulla classificazione delle sostanze e preparati pericolosi. Tale parere è stato poi superato dall’emanazione della Legge 28/2012 che ha affermato che per l’assegnazione della caratteristica di pericolo H14 si applicano i criteri e principi dell’accordo europeo relativo al trasporto internazionale delle merci pericolose su strada (noto come ADR da *European Agreement concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Road*), così come viene fatto in Austria.

Inoltre, come prima detto, la nuova direttiva ha introdotto per i rifiuti la caratteristica di pericolo H13 “Sensibilizzanti”.

Tale nuova caratteristica di pericolo corrisponde alle frasi di rischio della Direttiva 67/548/CEE:

- R42: può provocare sensibilizzazione per inalazione;
- R43: può provocare sensibilizzazione per contatto con la pelle.

Relativamente ad H13 “Sensibilizzanti”, è presente la nota: “se direttamente applicabile”.

La precedente definizione di H13 è stata sostituita con H15: “Rifiuti suscettibili, dopo l’eliminazione, di dare origine in qualche modo ad un’altra delle caratteristiche sopra elencate.”

Nelle “Note” all’Allegato I sono contenute alcune importanti considerazioni:

1. L’attribuzione delle caratteristiche di pericolo “tossico” (e “molto tossico”), “nocivo”, “corrosivo” e “irritante” “cancerogeno”, “tossico per la riproduzione”, “mutageno” ed “ecotossico” è effettuata secondo criteri stabiliti nell’allegato VI, parte I.A e parte II.B della Direttiva 67/548/CEE del Consiglio, del 27 giugno 1967 e successive modifiche e integrazioni, concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative alla classificazione, all’imballaggio e all’etichettatura delle sostanze pericolose.

2. Ove pertinente si applicano i valori limite di cui agli allegati II e III della Direttiva 1999/45/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 31 maggio 1999 concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative degli Stati membri relative alla classificazione, all’imballaggio e all’etichettatura dei preparati pericolosi.

Metodi di prova:

I metodi da utilizzare sono quelli riportati nell’allegato V della Direttiva 67/548/CEE e altre pertinenti note del CEN”.

Tale nota è più che pertinente poiché il quadro normativo al riguardo è incompleto e difficilmente migliorabile proprio per la intrinseca difficoltà di “misurare” tale proprietà. Infatti, tra i metodi di prova ai fini della valutazione e conseguente classificazione delle sostanze, contenuti nel Regolamento (CE) 440/2008 – successivamente integrato col Regolamento (CE) 761/2009 –, vi è solo quello relativo alla sensibilizzazione cutanea. L’applicabilità di detto test ai rifiuti in realtà assai poco praticabile per problemi sia tecnici che di costi; inoltre le disposizioni riportate nel Regolamento (CE) 1272/2008 al Capitolo 3.4 “Sensibilizzazione delle vie respiratorie o della pelle” forniscono sì indicazioni e criteri ma di certo non metodi di prova; pertanto ai fini della classificazione dei rifiuti come “sensibilizzanti” diventa necessario porre l’attenzione sulla eventuale presenza nel rifiuto di sostanze classificate con le frasi di rischio R42, R43 ed R42/43, valutandone poi le relative concentrazioni.

Quindi sempre di più vi è uno stretto legame tra classificazione dei rifiuti e classificazione delle sostanze e preparati pericolosi, già affermato dalla Direttiva 91/689/CEE, ora ancor più ribadito e rinforzato con l’indicare nella Direttiva 2008/98/CE sui rifiuti, la Direttiva 1999/45/CE sui preparati pericolosi (recepita in Italia con il DL.vo 65/2003) quale riferimento per i valori limite di concentrazione.

Va ricordato che in tutti i casi per i quali sono previsti dei limiti specifici nella colonna “Limiti di concentrazione” delle tabelle 3.1 e 3.2 del Regolamento (CE) 1272/2008 si applicano i valori limite ivi indicati, ove non sia indicato nulla, diventano invece pertinenti, appunto, i limiti di cui alla Direttiva 1999/45/CE (comunemente detti limiti convenzionali, di cui all’allegato I al DL.vo 65/2003).

È evidente che nella nota 1 sono richiamate anche altre caratteristiche di pericolo quali “comburente” o “sensibilizzante”, ma, ricordando la nota al punto 4 dell’introduzione all’allegato D:

“Ai fini del presente Allegato per sostanza pericolosa si intende qualsiasi sostanza che è o sarà classificata come pericolosa ai sensi della Direttiva 67/548/CEE e successive modifiche”,

definizione non nuova ma già contenuta nella previgente stesura del DL.vo 152/2006, è altrettanto evidente che i criteri di pericolosità di cui tenere conto ai fini della classificazione dei rifiuti sono quelli della classificazione delle sostanze e preparati anche per le caratteristiche di pericolo non espressamente citate.

Aspetto della diluizione e miscelazione

L'articolo 184, comma 5 ter afferma:

“La declassificazione da rifiuto pericoloso a rifiuto non pericoloso non può essere ottenuta attraverso una diluizione o una miscelazione del rifiuto che comporti una riduzione delle concentrazioni iniziali di sostanze pericolose sotto le soglie che definiscono il carattere pericoloso del rifiuto”.

Tale affermazione appare diretta principalmente ai produttori dei rifiuti poiché è inserita nell'articolo dedicato proprio alla classificazione, che rimane responsabilità e onere del produttore stesso.

Ai sensi dell'articolo 187:

“È vietato miscelare rifiuti pericolosi aventi differenti caratteristiche di pericolosità ovvero rifiuti pericolosi con rifiuti non pericolosi. La miscelazione comprende la diluizione di sostanze pericolose”.

Questo articolo consente quindi la miscelazione di rifiuti con le medesime caratteristiche di pericolo e, nei commi successivi, stabilisce l'obbligo di autorizzazione per tutti gli altri casi e le relative condizioni.

Si modifica quindi l'elemento che proibiva la miscelazione tra rifiuti “non miscelabili”: dalle precedenti “categorie di rifiuti” alle attuali differenti “caratteristiche di pericolo”. Va notato che il testo originale della direttiva faceva riferimento proprio alle “categorie di rifiuti” senza però precisare il significato di tali termini, lasciando così un vuoto normativo, che il legislatore italiano ha, almeno in parte, colmato.

Conclusioni

I criteri di classificazione dei rifiuti sono fondati sulle norme inerenti la classificazione delle sostanze e preparati pericolosi. Pertanto l'attribuzione delle caratteristiche di pericolo “H” è direttamente conseguente, ma sono rilevanti anche le connessioni e le ricadute in altri ambiti normativi: la valutazione del rischio chimico, gli incidenti rilevanti e, in parte, anche l'ADR (la disciplina per il trasporto su strada di merci pericolose). Di certo non sempre detta disciplina sulla classificazione delle sostanze e preparati pericolosi è direttamente e tecnicamente applicabile ad un “rifiuto”. Ad esempio i “metodi di prova” sono stati concepiti ai fini della sicurezza d'uso e manipolazione dei prodotti messi in commercio, di cui ovviamente il produttore conosce perfettamente la composizione, difficilmente saranno applicabili a matrici complesse ed eterogenee quali sono i rifiuti, per i quali, infatti, solo raramente è possibile identificare tutte le sostanze che li compongono. Ciò costituisce un evidente limite tecnico.

Un ulteriore aspetto problematico è costituito dal fatto che le frasi di rischio sono attribuite ad ogni sostanza contenuta nel rifiuto. Pertanto qualora le sostanze non siano ufficialmente classificate, sarà necessario reperire le relative schede di sicurezza aggiornate, redatte ai sensi del Regolamento (UE) 453/2010, ricercando nella “Sezione 15” la classificazione e le frasi di

rischio attribuite dal fabbricante, produttore o importatore. Tali figure sono, infatti, tenute a dare per qualunque sostanza non presunta nell'Allegato VI una classificazione provvisoria basata su ricerche e test da essi effettuati e sui criteri di classificazione standard previsti dall'Unione Europea. Ove non disponibili neanche le schede di sicurezza, si dovrà fare riferimento alla letteratura scientifica per ricercare i dati sulle proprietà chimico-fisiche, tossicologiche ed ecotossicologiche dei componenti del rifiuto (ogni singola sostanza presente).

Quanto sopra detto può costituire una "criticità" per la classificazione di un rifiuto, che in genere in base alla disciplina vigente in tema di gestione dei rifiuti, deve essere condotta in tempi celeri, in quanto il rifiuto va smaltito/trattato nel più breve tempo possibile dal momento della sua generazione o del suo conferimento ad impianto autorizzato.

Bibliografia di riferimento

Europa. Direttiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 19 novembre 2008 "Relativa ai rifiuti e che abroga alcune direttive". *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* n. L 312/3, 22 novembre 2008;

Europa. Regolamento CE N. 453//2010 della Commissione Europea del 20 maggio 2010 recante modifica del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 133, 31 maggio 2010

Italia. Decreto Legislativo 14 marzo 2003, n.65. Attuazione delle direttive 1999/45/CE e 2001/60/CE relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura dei preparati pericolosi. *Gazzetta Ufficiale - Supplemento ordinario* 87, 14 aprile 2003.

Italia. Decreto Legislativo n. 205 del 03 dicembre 2010. Disposizioni di attuazione della direttiva 2008/98/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 19 novembre 2008 relativa ai rifiuti e che abroga alcune direttive. *Supplemento Ordinario alla Gazzetta Ufficiale* n. 288, 10 dicembre 2010;

Italia. Legge 24 marzo 2012, n. 28. Conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 25 gennaio 2012, n. 2, recante misure straordinarie e urgenti in materia ambientale. *Gazzetta Ufficiale* n. 71, 24 marzo 2012.

United Nations. *ADR (applicable as from 1 January 2013). European Agreement concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Road*. New York, Geneva: United Nations, 2012.

CLASSIFICAZIONE DEI RIFIUTI PER LA CARATTERISTICA H14 “ECOTOSSICO” NEI NUOVI RISVOLTI NORMATIVI (LEGGE 28/2012)

Federica Tommasi

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Novità normative

La caratteristica di Pericolo H14 “Ecotossico” è una delle quindici caratteristiche di pericolo che si possono o debbono – se accertate *ab origine* – attribuire ai rifiuti, nell’ambito della loro corretta gestione, manipolazione, imballaggio nonché trasporto per un effettivo, tracciabile e sicuro smaltimento e/o recupero del rifiuto medesimo.

Le caratteristiche di Pericolo sono definite all’Allegato I al DL.vo 152 del 3 aprile 2006 e s.m.i. (1). La caratteristica di Pericolo H14 “Ecotossico” è definita nel modo seguente:

“H14 “Ecotossico”: rifiuti che presentano o possono presentare rischi immediati o differiti per uno o più comparti ambientali”.

Ai sensi della Nota 1 all’Allegato I del DL.vo 152/2006, le caratteristiche di pericolo dei rifiuti si attribuiscono in base ai criteri delle norme vigenti in tema di classificazione delle sostanze e preparati pericolosi:

“L’attribuzione delle caratteristiche di pericolo “tossico” (e “molto tossico”), “nocivo”, “corrosivo” e “irritante” “cancerogeno”, “tossico per la riproduzione”, “mutageno” ed “ecotossico” è effettuata secondo i criteri stabiliti nell’allegato VI, parte I.A e parte II.B della Direttiva 67/548/CEE del Consiglio, del 27 giugno 1967 e successive modifiche e integrazioni, concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative alla classificazione, all’imballaggio e all’etichettatura delle sostanze pericolose”.

Le più recenti disposizioni normative, con l’approvazione della Legge n. 28 del 24 marzo 2012 (2) hanno comportato un repentino cambiamento circa le modalità di attribuzione della caratteristica di Pericolo H14 ai rifiuti, rispetto a come era stata delineata, dal Quarto Correttivo al DL.vo 152/2006 (1), ovvero il DL.vo 205 del 3 dicembre 2010 (3) che aveva concretizzato l’adeguamento al contesto normativo europeo, creando difficoltà ed in parte confusione interpretativa.

Infatti con l’art. 3, comma 6, della Legge 28/2012 (2), viene così sostituito il punto 5 dell’Allegato I del DL.vo 152/2006 e s.m.i.:

“5. Se un rifiuto è identificato come pericoloso mediante riferimento specifico o generico a sostanze pericolose, esso è classificato come pericoloso solo se le sostanze raggiungono determinate concentrazioni (ad esempio, percentuale tali da conferire al rifiuto in questione una o più proprietà di cui all’allegato I. Per le caratteristiche da H3 a H8, H10 e H11, di cui all’allegato I, si applica quanto previsto al punto 3.4 del presente allegato. Per le caratteristiche H1, H2, H9, H12, H13 e H14, di cui all’allegato I la decisione 2000/532/CE non prevede al momento alcuna specifica. Nelle more dell’adozione, da parte del Ministero dell’ambiente e della tutela del territorio e del mare, di uno specifico decreto che stabilisca la procedura tecnica

per l'attribuzione della caratteristica H14, sentito il parere dell'ISPRA, tale caratteristica viene attribuita ai rifiuti secondo le modalità dell'accordo ADR per la classe 9 - M6 e M7".

Si introduce dunque, nelle more dell'adozione di un Decreto Ministeriale *ad hoc*, l'utilizzo per l'attribuzione di tale caratteristica di Pericolo dell'ADR 2011 acronimo indicante l'"Accord européen relatif au transport international des marchandises Dangereuses par Route", ovvero "Accordo europeo relativo al trasporto internazionale delle merci pericolose su strada" teso ad indicare la gerarchia di pericolo da verificare sulle sostanze preparati e miscele, anche di rifiuti che sono sottoposti al trasporto su strada; sulla scorta di tale regolamento il trasporto di tali merci è quindi è sottoposto ad un regime di prescrizioni, precauzioni, indicazioni e dispositivi tecnici funzionali al fine di garantirne la sicurezza.

Tale cambiamento, in prima battuta, ci consente le seguenti osservazioni:

- L'introduzione, ex novo nel panorama italiano, ai fini della classificazione per la caratteristica di pericolo H14, dell'Accordo ADR secondo la Classe 9: M6 ed M7 - materie pericolose per l'ambiente acquatico, rispettivamente liquide e solide, versione 2010, entrata in vigore dal luglio 2011 per il trasporto su gomma interno delle merci, anche pericolose per l'ambiente, in analogia all'Austria (4).
- La Legge 28/2012 (2) sostituisce il punto 5 dell'allegato D, ma lascia invariate le Note 1 e 2 dell'Allegato I, le quali, per l'attribuzione delle caratteristiche di pericolo H4, H5, H6, H7, H8, H10, H11, ed H14, rimandavano ai criteri dell'Allegato VI della Direttiva 67/548/CEE (5) e ai limiti della Direttiva 1999/45/CE (6), che quindi rimangono vigenti per le caratteristiche di pericolo da H4 ad H8, H10 ed H11.
- Permane la necessità, riconfermata anche in questa modifica, della completa caratterizzazione del rifiuto con attribuzione della caratteristica di pericolo, anche per l'ecotossicità H14, qualora le sostanze o composti presenti nel rifiuto superino determinati valori soglia in analogia a quanto avviene per altre caratteristiche di pericolo nell'Allegato I del DL.vo 152/2006 di recepimento della Decisione della Commissione 2000/532/CE del 3 maggio 2000 (7).

Con tale modifica apportata al DL.vo 152/2006 e s.m.i. si variano consistentemente quindi solo le modalità di attribuzione della caratteristica di pericolo H14 per i rifiuti individuati con "voci speculari" – ovvero quelli che possono o meno essere pericolosi solo in funzione delle concentrazioni delle sostanze pericolose che lo caratterizzano nel dettaglio – introducendo la grande novità dell'utilizzo delle modalità dell'Accordo ADR (4).

Risulta dunque doveroso introdurre un livello di raffronto tra il pregresso dispositivo, ovvero la norma di classificazione comunitaria – la Direttiva 67/548/CEE (5) che si sta travasando progressivamente nel più recente Regolamento (CE) 1272/2008 (8) cosiddetto CLP, il cui completo vigore regolatorio vedrà la luce il 1° giugno 2015 – e l'Accordo ADR (4).

Infatti, tali norme non sono armoniche tra di loro e definiscono diversi livelli di ecotossicità (intesa come pericolosità per l'ambiente acquatico, l'unica attualmente normata dalle disposizioni comunitarie) contraddistinti con le Frasi di Rischio (secondo i dettami della pregressa norma Direttiva 67/548/CEE ormai in fase di superamento) (5) o con le Indicazioni di Pericolo (secondo i dettami della nuova legislazione comunitaria Regolamento (CE) 1272/2008 che entrerà completamente in vigore, in tutte le sue parti costitutive il 1 giugno 2015) (8). La Tabella 1 raffronta tale evoluzione normativa in seno alla Comunità Europea, con le correlazioni rintracciabili con un altro dispositivo regolatorio internazionale, ovvero l'ADR 2011 (4).

Tabella 1. Definizioni di sostanze e preparati pericolosi: confronto tra normative quadro di settore

Fraasi di rischio <i>Direttiva 67/548/CEE</i>	Indicazioni di pericolo <i>Regolamento (CE) 1272/2008</i>	Merce pericolosa <i>ai sensi ADR</i>
R50 altamente tossico per gli organismi acquatici	H400 Molto tossico per gli organismi acquatici (<i>Aquatic acute 1</i>)	sì
R51 tossico per gli organismi acquatici	Non c'è corrispondenza	no
R52 nocivo per gli organismi acquatici	Non c'è corrispondenza	no
R53 può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico	H413 può essere nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata (<i>Aquatic chronic 4</i>)	no
R50/53 altamente tossico per gli organismi acquatici, può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico	H400 Molto tossico per gli organismi acquatici (<i>Aquatic acute 1</i>) H410 Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata (<i>Aquatic chronic 1</i>)	sì
R51/53 tossico per gli organismi acquatici, può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico	H411 tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata (<i>Aquatic chronic 2</i>)	sì
R52/53 nocivo per gli organismi acquatici, può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico	H412 nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata (<i>Aquatic chronic 3</i>)	no

In applicazione della Legge 28/2012 (2) che dispone di utilizzare l'ADR (4), quindi, il rifiuto sarà "Ecotossico" e prenderà, in seno al processo di classificazione che valuterà tutte le frasi di rischio/indicazioni di pericolo delle sostanze, miscele, preparati individuate ed in esso contenute nella determinata concentrazione del singolo lotto in classificazione, anche l'attribuzione della caratteristica di Pericolo H14 solo nei casi evidenziati dal "sì" nella terza colonna relativa all'Accordo ADR (4). Il quadro sinottico sopra riportato, riassume bene e sinteticamente quanto detto mettendo in evidenza i cambiamenti apportati dalla norma.

Contesto normativo pregresso

Di fatto la caratteristica di pericolo H14 "Ecotossico", pur essendo stata definita da tempo, era rimasta in un limbo dovuto alla assenza di norme di dettaglio che ne definissero le modalità di applicazione, insieme ad altre classi di pericolo: basta citare il solo esempio dell'H15, fino a quel momento in attesa di esaustive e operative modalità di valutazione e applicazione alla classificazione del rifiuto.

Con l'introduzione sulla scena del contesto europeo delle modifiche e novità apportate dalla Direttiva 2008/98/CE del 19 novembre 2008 (9), la quale, tra le altre cose, al punto 14 delle premesse allineava pienamente la normativa sui rifiuti a quella in materia di classificazione delle sostanze e preparati pericolosi (anche per le metodologie analitiche):

"La classificazione dei rifiuti come pericolosi dovrebbe essere basata [...] sulla normativa comunitaria relativa alle sostanze chimiche, in particolare per quanto concerne la classificazione dei preparati come pericolosi, inclusi i valori limite di concentrazione usati a tal fine. I rifiuti pericolosi dovrebbero essere regolamentati con specifiche rigorose, al fine di impedire o limitare, per quanto possibile, le potenziali conseguenze negative sull'ambiente e sulla salute umana di una gestione inadeguata".

Quindi questa direttiva, da un lato, sanciva a chiare lettere il travaso oramai invalso della normativa sulla classificazione delle sostanze e preparati (5, 6, 8, 10-12) a quella dei rifiuti, e, da un lato, andava anche a disciplinare una volta per tutte l'obbligo di classificare i rifiuti anche per la caratteristica H14.

In Italia il recepimento di questa direttiva è avvenuto con l'entrata in vigore del DL.vo 205/2010 (3), che di fatto ha reso obbligatoria anche la determinazione della caratteristica di pericolo H14 "Ecotossico", con particolare riferimento all'ambiente acquatico, proprio con gli specifici rimandi alla normativa comunitaria per la classificazione, etichettatura e imballaggio delle sostanze e delle miscele. Le Note 1 e 2 dell'Allegato I rimandavano, infatti, alle modalità dettate dalle Direttive 67/548/CEE (5) e 1999/45/CE (6).

La finestra temporale – compresa tra il dicembre 2010, giorno di entrata in vigore del DL.vo 205/2010 (3) e il giorno di entrata in vigore della Legge 28 del 24 marzo 2012 (2) – comportava, senza incertezza, l'obbligo dell'uso, ai fini della classificazione H14, delle direttive comunitarie appena citate. Tutte le normative in tema di classificazione delle sostanze pericolose e relativi Adeguamenti ai Progressi Tecnici (APT), funzionali a tale processo, nel periodo temporale indicato, sono:

- *Normative madre a livello comunitario*
 - Direttiva 67/548/CEE (5)
 - Direttiva 2008/58/CE (30° APT della Direttiva 67/548/CEE) (13)
 - Direttiva 2009/2/CE (31° APT Direttiva 67/548/CEE) (14)
 - Direttiva 1999/45/CE (6)
 - Regolamento (CE) 1272/2008 (denominato CLP: *Classification, Labelling and Packaging*) che adotta i criteri del GHS (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*) (8)
 - Regolamento (CE) 790/2009 (1° APT del Regolamento CLP) (15)
 - Regolamento (UE) 286/2011 (2° APT del Regolamento CLP) (16);
- *Attuativi nazionali*
 - Decreto del Ministero della Salute 28/2/2006 (17) (recepimento del 29° APT della Direttiva 67/548/CEE), modificato con il Decreto del Ministero della Salute 3/4/2007 (18)
 - DL.vo 65/2003 (19), come modificato con il Decreto del Ministero della Salute 3/4/2007 (18) (Recepimento della Direttiva 1999/45/CE) (6).

Nel contesto normativo nazionale, in funzione dello scadenziario (che si completerà al 1 giugno 2015) di entrata in vigore del cosiddetto Regolamento CLP 1272/2008 e relativi APT, per i preparati – o miscele – vige ancora il DL.vo 65/2003).

In questo contesto, prima dell'entrata in vigore della Legge 28/2012 (2), avveniva quanto segue:

- il rifiuto doveva essere analizzato, e caratterizzato al fine di individuarne, nell'ambito del processo produttivo che lo originava, qualitativamente e quantitativamente tutte le plausibili sostanze, miscele, preparati, sino ai singoli componenti (anche semplicemente in forma ionica) che potessero comportare un pericolo, e la cui valutazione fosse funzionale al confronto con tutti i limiti relativi alle caratteristiche di pericolo, tra cui l'H14;
- il rifiuto, così concepito come una miscela, veniva soggetto a una disamina analoga a quella che si intraprende in caso di classificazione di un preparato o miscela, rapportandosi, per i limiti specifici di ogni singolo componente, all'Allegato I della Direttiva 67/548/CEE (5) (come modificato dall'Allegato VI, Tabella 3.2, del

Regolamento (CE) 1272/2008) (8), ma valutato nel complesso come miscela – e quindi con il criterio della sommatoria – secondo le disposizioni della Direttiva 67/548/CEE (5) (con tutti i relativi APT e le formazioni nazionali del corrispondente recepimento delle direttive di origine comunitaria), imputando eventuali limiti generici, applicate le metodiche di sommatoria dei singoli effetti delle sostanze, secondo i criteri stabiliti nella Direttiva 1999/45/CE (6);

- l'applicazione, ormai generalmente invalsa, del principio di massima cautela, ovvero del “worst case scenario”: qualora, durante la determinazione analitica delle sostanze presenti nel rifiuto, non fosse immediata la determinazione della forma chimica del composto (sale, ossido, idrossido, ecc.), in special modo per metalli e metalloidi, si considerano tutti i composti sempre nella forma più pericolosa anche al fine di determinare la caratteristica di Pericolo H14.
- la determinazione dell'H14, mediante l'utilizzo alternativo e sperimentale, del Parere ISS/ISPRA (parere congiunto tra Istituto Superiore di Sanità e Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale), Prot. ISS n. 40832 del 29/09/2011, reso al Ministero dell'Ambiente (20) e avente ad oggetto: “Attuazione dell'Art. 184, comma 5, del DL.vo 152/2006: parere in merito all'applicazione della classificazione dei rifiuti, con particolare riferimento alla caratteristica H14 “Ecotossico”, introdotta dagli allegati D ed I del DL.vo 205/2010.”

Con l'intento di fare un quadro sulle principali problematiche insorte nella classificazione dei rifiuti a seguito dell'introduzione anche della caratteristica di Pericolo H14, il Parere congiunto ISS/ISPRA proponeva operativamente:

- versione semplificata dei criteri di sommatoria (da 8 a 4 equazioni) riconducibili alle modalità applicative delle direttive europee sulla classificazione dei preparati e miscele come pericolose (5, 6, 8, 10-12);
- semplificazione dei *cut-off* in ingresso per le sostanze pericolose presenti nel rifiuto (21-23);
- utilizzo dei limiti generici rispetto a quelli sostanza-specifici nelle equazioni (18, 19, 24);
- introduzione innovativa dell'opzione di utilizzo dei biotest in caso di composizione non nota del rifiuto (25-40).

In tale scorcio temporale, di cui si è già parlato sopra, tra l'entrata in vigore del DL.vo 205/2010 e le ultime disposizioni di cui alla Legge 28/2012, il Parere ISS/ISPRA, rilevando le difficoltà oggettive di una applicazione pedissequa della normativa sulla classificazione delle sostanze, intendeva portare un contributo di semplificazione interpretativa. Se da un lato rimaneva vigente, a scelta dell'operatore con l'onere della caratterizzazione, la struttura del metodo della sommatoria (seppur semplificato), dall'altro si proponeva l'approccio collegato alla possibilità o meno di conoscere *ex ante* approfonditamente la composizione del rifiuto (anche legata a motivi sia di costo che strettamente tecnici relativi alla totale assenza di informazioni sui rifiuti da dover gestire) (es. le terre contaminate in siti ad elevatissima pressione antropica/industriale). Si prevede inoltre la scelta opzionale dei biotest mutuati dalle esperienze internazionali ormai in letteratura e comunque in parte sovrapponibili proprio a quelli utilizzati per la classificazione delle sostanze con un criterio analogo di produzione dei risultati ma con dei limiti di caratterizzazione legati al reale destino del rifiuto che doveva essere smaltito.

Seppure nella semplificazione, il Parere manteneva la “pesatura” di ogni contributo alla caratterizzazione del rifiuto; se infatti lo si raffronta con la successiva applicazione dell'Accordo ADR si riscontra la seguente discrepanza: con le ultime disposizioni che introducono l'Accordo ADR, di fatto si perdono le informazioni legate alla nocività a lungo termine delle sostanze

contenute nel rifiuto, sebbene queste siano addirittura insite nella definizione della “ecotossicità” delle sostanze fino alla definizione stessa di “ecotossicità” di cui alle premesse.

Se, infatti, il Parere ISS/ISPRA considerava comunque tutte le frasi nel metodo della sommatoria, la disposizione di applicare l’Accordo ADR di fatto rimanda davvero ad un metodo semplificato che si riduce ad utilizzare solo le prime tre combinazioni riportate in Tabella 2, relative alle frasi di Rischio R50, R50-53, R51-53.

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

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

Sebbene l’avvento della Legge 28/2012 sia stato auspicato ed accolto come una semplificazione dagli operatori del settore rifiuti, argomenteremo in seguito come in realtà tale approccio è comunque gravato da vincoli e difficoltà interpretative dovute alla graduale introduzione dell’applicazione completa del Regolamento (CE) 1272/2008, che nel 1° giugno 2015 troverà la sua piena applicazione con la definitiva entrata in vigore della parte relativa alla classificazione di preparati e miscele.

Il parere ISS/ISPRA non ha più alcuna validità, semplicemente per l’entrata in vigore della Legge 28/2012 (2) che ne annulla gli elementi propositivi, e rimanda all’Accordo ADR (4), ma vediamo quali possano essere le esperienze ereditate.

Un rifiuto, nel caso in cui non fosse conosciuta la composizione chimica di dettaglio, veniva classificato come pericoloso per la caratteristica H14 qualora fossero superati, a seguito della scelta dell’effettuazione dei test ecotossicologici (20, 25-32), condotti sull’eluato (20, 25, 26, 32), prodotto secondo la norma UNI EN 14735:2005 (25), uno o più dei valori limite riportati in Tabella 3.

Tabella 3. Valori limite di tossicità dell’eluato ai fini della classificazione del rifiuto come pericoloso per la caratteristica H14, di cui dal parere ISS/ISPRA 29/09/2011 Prot. ISS n. 40823

Test di ecotossicità	Valore limite*	Riferimento bibliografico
Saggio di tossicità con <i>Vibrio fischeri</i>	EC ₅₀ < 10%	28-30
Test con <i>Pseudokirchneriella sub capitata</i>	EC ₂₀ < 20%	31
Test con <i>Daphnia magna</i>	EC ₅₀ < 10%	27

EC: Effective Concentration

Il limite percentuale imposto pari al 10% (o 20%: cioè rapporto di diluizione pari a 1:10 o 1:5) si intende riferito alla concentrazione dell'eluato del rifiuto che viene prodotto per testarne la tossicità del medesimo nell'ambiente acquatico ai fini dell'espressione del risultato della singola prova biologica (biotest per il mezzo acquatico) sul rifiuto.

Questo risultato ecotossicologico viene espresso con due distinti *end point*: EC₅₀, EC₂₀, il cui significato è riconducibile alla seguente definizione come EC₅₀ (concentrazione effettiva di una sostanza il cui effetto corrisponde al 50% della risposta massima).

Quindi, nello specifico delle prove proposte, il rifiuto prende l'attribuzione della caratteristica di ecotossico:

- se il saggio di tossicità con *Vibrio Fischeri* presenta una EC₅₀ già per un eluato la cui concentrazione in rifiuto è al di sotto del 10%;
- se il test con *Pseudokirchneriella sub capitata* presenta una EC₂₀ già per un eluato la cui concentrazione in rifiuto è al di sotto del 20%;
- se il test con *Daphnia magna* presenta una EC₅₀ già per un eluato la cui concentrazione in rifiuto è al di sotto del 10%.

L'eluato suddetto viene prodotto secondo le specifiche dettate dalla norma UNI EN 14735: 2005 (25) (richiamando integralmente la norma UNI EN 12457-2: 2004) (26), che rappresenta la porta di ingresso standardizzata ormai a livello internazionale in letteratura (33-40) per la gestione e preparazione dei rifiuti per prove ecotossicologiche.

Questo tentativo, puramente di *review*, dell'esperienza internazionale sulla sperimentazione ecotossicologica anche applicata ai rifiuti è rimasto, di fatto, un germe non coltivato, e i cui spunti sembrano sinora inascoltati nel panorama nazionale normativo, rimandando *de facto* la nuova norma (2) al solo contributo ISPRA al redigendo decreto ministeriale per attribuire tale caratteristica di Pericolo (H14).

Nuove modifiche della norma ambientale: implicazioni e possibili scenari

L'introduzione, con la Legge 28/2012, dell'Accordo ADR per l'attribuzione della caratteristica di pericolo H14 ai rifiuti, comporta di fatto tutta una serie di implicazioni pratiche per gli operatori del settore (i detentori con l'onere della classificazione).

Definizioni dell'Accordo ADR

La ratio dell'Accordo ADR, che riguarda il complesso di norme per il trasporto su strada delle merci pericolose, si basa su di un processo logico decisionale basato sui seguenti elementi progressivi, peraltro mutuati, a loro volta, dal complesso di regolamenti alla base della classificazione etichettatura e imballaggio delle sostanze e miscele:

- dati tossicologici eseguiti su 3 specie (pesci, daphnie, alghe);
- dati di bioaccumulo;
- dati di biodegradabilità.

Considerato che nell'Accordo ADR (Par. 2.2.9.1.10.2.3 e 4) la tossicità acuta per l'ambiente acquatico, è definita come:

“la proprietà intrinseca di una sostanza di essere nociva ad un organismo acquatico nel corso di un'esposizione di breve durata a quella sostanza nell'ambiente acquatico.”

Dagli esiti di questo processo si possono avere sostanze classificate come:

– *Pericolo acuto (di breve durata)*

Definito come:

“[...] ai fini della classificazione, il pericolo di un prodotto chimico che deriva dalla sua tossicità acuta per un organismo nel corso di un’esposizione di breve durata a quel prodotto chimico nell’ambiente acquatico. La tossicità acquatica acuta per l’ambiente acquatico deve essere determinata normalmente facendo riferimento alla CL50 96 ore sui pesci (Linea Guida 203 dell’OSCE o prova equivalente), alla CE50 48 ore sui crostacei (Linea Guida 202 dell’OSCE o prova equivalente) e/o alla CE50 72 o 96 ore su come rappresentative di tutti gli organismi acquatici e i dati relativi ad altre specie come Lemna possono anche essere presi in considerazione se il metodo di prova è appropriato.”

– *Tossicità cronica per l’ambiente acquatico*

Definito come:

“[...] la proprietà intrinseca di una sostanza di essere nociva ad un organismo acquatico nel corso di esposizioni nell’ambiente acquatico che sono determinate in relazione con il ciclo di vita di questi organismi.”

– *Pericolo di lunga durata*

Definito come:

“[...] ai fini della classificazione, il pericolo di un prodotto chimico che deriva dalla sua tossicità cronica a seguito di un’esposizione a lunga durata nell’ambiente acquatico. Esistono meno dati sulla tossicità cronica che sulla tossicità acuta e l’insieme delle prove è meno normalizzato. I dati contenuti secondo le linee guida dell’OCSE 210 (Pesce ai primi stadi di vita) o 211 (Daphnia, prova di riproduzione) e 201 (Alghe, prova inibizione della crescita) sono accettabili.”

Tali dati di natura tossicologica trovano definizione nella Tabella 2.2.9.1.10.3.1 (4), in cui per ciascuna prova si riportano anche i relativi limiti di concentrazione funzionali alla valutazione della singola prova effettuata. Nel momento in cui tali limiti, per una o più di una di esse vengano superati la sostanza indagata, risulta ottenere la classificazione di Categoria: Acuta 1 (lettera a), Cronica 1 (lettera b), oppure Cronica 2 (lettera b).

Le suddette singole sostanze sono ovviamente ipotizzate comporre o contaminare il rifiuto in esame.

Per la classificazione dei rifiuti, secondo per la caratteristica di Pericolo H14 non si deve distinguere tra le diverse pericolosità: basta il grado di pericolo più basso per far scattare la classificazione H14 “Ecotossico”, ovvero il Cronico 2. Per comprendere questo passaggio basta riflettere sul fatto che tale grado di pericolo corrisponde alla combinazioni di Frasi di Rischio secondo la vecchia normativa sulle sostanze (5, 6, 18, 19, 24), alla coppia: R51-53 “Tossico per gli organismi acquatici e può provocare a lungo termine effetti negativi per l’ambiente acquatico” (vedi Tabella 2).

È doveroso effettuare un inciso al fine di comprendere quindi come ci si addentra nella classificazione dei rifiuti secondo l’Accordo ADR. Quanto appena detto vale per singole sostanze che possano contaminare una matrice che assurge alla qualifica giuridica di rifiuto e della quale il detentore si voglia disfare, e in conseguenza di ciò maturando l’obbligo di effettuarne la caratterizzazione.

L’accadimento di contaminazione da una singola sostanza è raro e sporadico: nella stragrande maggioranza dei rifiuti gestiti e smaltiti, si ha a che fare con miscele, o contaminazioni multiple da sostanze, sia in ragione dei processi industriali, di ricerca, di gestione urbana, che li originano, sia per la natura di una contaminazione antropica più o meno

stratificatasi nel tempo (es. suoli da bonificare in storiche aree industriali delle fasce suburbane del Paese).

Processo della classificazione secondo l'Accordo ADR

Quando si ha a che fare con delle miscele, analogamente alle sostanze, questo comporta sempre un processo di classificazione che utilizza un approccio graduale che a sua volta dipende dal tipo di informazioni disponibili:

- *Classificazione fondata sulle miscele provate*
dati sperimentali da banche dati pubbliche o indicazioni nelle direttive comunitarie;
- *Classificazione fondata sui Principi Ponte*
Esempio al Paragrafo 2.2.9.1.10.4.4.5 (Interpolazione all'interno di una stessa categoria di tossicità) si esplicita un caso:

“Nel caso di tre miscele (A, B e C) aventi componenti identici, dove le miscele A e B sono state testate e sono nella stessa categoria di tossicità e dove la miscela C non testata contiene gli stessi componenti tossicologicamente attivi delle miscele A e B ma ha concentrazioni intermedie dei componenti tossicologicamente attivi rispetto a quelle presenti nelle miscele A e B, allora si considera che la miscela C appartiene alla stessa categoria di tossicità di A e B.”

Oppure nel Paragrafo 2.2.9.1.10.4.4.6 (Miscele sostanzialmente simili) se ne esplicita un altro:

“Nel seguente caso: (a) Due miscele: (i) A + B (ii) C + B; (b) la concentrazione del componente B è essenzialmente la stessa nelle due miscele; (c) la concentrazione del componente A nella miscela (i) è uguale a quella del componente C nella miscela (ii); (d) i dati sui pericoli per l'ambiente acquatico di A e C sono disponibili e sostanzialmente equivalenti, cioè le due sostanze appartengono alla stessa categoria di pericolo e non interferiscono con la tossicità di B, se la miscela (i) o (ii) è stata già classificata sulla base di dati sperimentali, allora l'altra miscela deve essere classificata nella stessa categoria di pericolo.”;

- *Metodo delle sommatorie*
Si sommano gli effetti nocivi delle singole sostanze provate così come avveniva nella applicazione delle direttive comunitarie sulla classificazione delle sostanze e preparati pericolosi (4-6, 8);
- *Metodo sperimentale*
Effettuazione in estrema ratio di prove biologiche (*Daphnia*, pesce, alghe, con metodi standardizzati dell'OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) sul singolo rifiuto da caratterizzare per la sola caratteristica di Pericolo H14 (4).

L'adozione dell'Accordo ADR (4) ai rifiuti, intesi come una miscela di contaminanti, comporta l'applicazione della casistica progressiva sotto enunciata, la quale riassume in estrema sintesi quanto enunciato nell'Accordo ADR stesso (per dettaglio nei paragrafi da 2.2.9.1.10.2, 2.2.9.1.10.3, 2.2.9.1.10.4 e relativi sottoparagrafi per brevità non dettagliati), nel dettaglio questa procedura è quella del metodo della Sommatoria di cui al Paragrafo 2.2.1.10.4.6 dell'Accordo ADR (4):

1. Verranno presi in considerazione nella sommatoria solo i componenti con tossicità Acuta e/o Cronica 1 con concentrazione >0,1% (massa) e i componenti con tossicità Cronica 2 con concentrazione >1% (massa) (criterio di ingresso alla valutazione combinata del

singolo contributo di tutte le sostanze rintracciate). Infatti, letteralmente il Paragrafo 2.2.9.1.10.4.1 (Criteri di classificazione delle miscele) sentenzia:

“Il sistema di classificazione delle miscele riprende tutte le categorie di classificazione utilizzate per le sostanze: le categorie Acuta 1 e cronica 1 e 2. Allo scopo di utilizzare tutti i dati disponibili ai fini della classificazione della miscela per l’ambiente acquatico, si formula e si applica, ove del caso, la seguente assunzione. I “componenti rilevanti” di una miscela sono quelli la cui concentrazione è uguale o superiore a 0,1% (massa) per i componenti classificati come aventi una tossicità Acuta e/o Cronica 1, e uguale o superiore a 1% (massa) per gli altri componenti, salvo che si supponga (per esempio nel caso di un componente molto tossico) che un componente presente a una concentrazione inferiore a 0,1% giustifichi nondimeno la classificazione della miscela per il pericolo che presenta per l’ambiente acquatico.”

È doveroso sottolineare che tale paragrafo è identico al Paragrafo 4.1.3.1 del Regolamento (UE) 286/2011 recante modifica, ai fini dell’adeguamento al progresso tecnico e scientifico, del Regolamento (CE) 1272/2008 relativo alla classificazione, all’etichettatura e all’imballaggio delle sostanze e delle miscele (il 2° APT al CLP del 2011);

2. Se la somma di tutti i componenti classificati con tossicità Acuta 1 è $\geq 25\%$ il rifiuto risulta essere pericoloso: attribuzione della caratteristica di Pericolo H14 “Ecotossico”;
3. Se la somma di tutti i componenti classificati con tossicità Cronica 1 è $\geq 25\%$ il rifiuto risulta essere pericoloso: attribuzione della caratteristica di Pericolo H14 “Ecotossico”;
4. Se sono presenti sia componenti classificati con tossicità Cronica 1 e Cronica 2 si applicherà la seguente formula:

$$(10 \times \text{Cronica 1}) + \text{Cronica 2} \geq 25\%$$

il rifiuto risulta essere pericoloso: attribuzione della caratteristica di Pericolo H14 “Ecotossico”;

5. Per tutti i componenti classificati con tossicità Acuta 1, Cronica 1 e 2 si applicano i fattori M (dettagliatamente spiegati al Paragrafo 2.2.9.1.10.4.6.4 e in Tabella 2.2.9.1.10.4.6.4 dell’Accordo ADR) (4).

Tali fattori M non sono altro che fattori moltiplicativi, da attribuire alla singola sostanza estremamente tossica – secondo letteratura, da banche dati od in singola classificazione secondo Regolamento CLP (8) – i quali realizzano, a seconda della estrema e comprovata tossicità della sostanza un effetto di magnificazione dell’effetto nella sommatoria per il contributo di detta sostanza anche a concentrazioni estremamente basse, per tenere conto dell’aggravio di gestione, che anche piccole quantità di dette sostanze possano provocare in miscela anche quando questo contributo è in un rifiuto.

Conclusioni

Volendo dunque differentemente riassumere quanto detto: la pratica della caratterizzazione dei rifiuti per questa classe di pericolo trova come conseguenze la permanenza dell’obbligo della caratterizzazione del rifiuto, come in precedenza.

Differentemente dall’approccio con le normative comunitarie di classificazione di sostanze e preparati (5, 8) si realizza, con l’utilizzo dell’Accordo ADR, un innalzamento dei limiti per l’imputazione della stessa caratteristica di pericolo, la quale si attesta in maniera generica al

25% (ovverosia fino ad un massimo di 250.000 mg/kg_{ss} nel rifiuto di sostanze pericolose, senza limiti specifici per la pericolosità per l'ambiente), a meno dell'applicazione del fattore M per le categorie Acuta 1 e Cronica 1 che potrebbe portare anche a concentrazioni molto più basse (di ordini di grandezza compresi tra 10 e 10000).

Questa specifica caratterizzazione secondo l'ADR avviene con l'applicazione progressiva, della seguente procedura teorica:

1. ricerca dei componenti della miscela che caratterizzano il rifiuto;
2. loro inquadramento attraverso i seguenti elementi: tossicità Acuta e Cronica di classe 1 e 2 per l'ambiente acquatico, bioaccumulo e biodegradazione ai fini della classificazione;
3. in funzione delle reali possibilità di conoscere la composizione e la pericolosità del rifiuto, procedimento graduale di classificazione fondata sulle miscele provate, sui Principi Ponte (che però mal si applicano ai rifiuti) sino alla applicazione del metodo della somma sui componenti che si sono riusciti ad individuare e classificare con l'applicazione delle formule di additività, secondo la procedura riassunta nella Figura 2.2.9.1.10.4.2 dell'Accordo ADR (4);
4. principio di conservatività rispetto ai risultati ottenuti in modi diversi, e/o rispetto al gruppo tassonomico più sensibile;
5. le somme ottenute tramite tale procedimento vengono confrontati coi limiti di cui alle Tabelle 2.2.9.1.10.4.6.2.2 e 2.2.9.1.10.4.6.3.3 con l'eventuale applicazione dei fattori moltiplicativi M come da Tabella 2.2.9.1.10.4.6.4 sempre dell'Accordo ADR (4);
6. nel caso non si abbiano informazioni utili sulla tossicità acuta e/o cronica della sostanza/e in miscela si rimanda a materie e miscele classificate come pericolose per l'ambiente acquatico sulla base del Regolamento n. 1272/2008/CE (denominato CLP) l'approccio è quello del Paragrafo 2.2.9.1.10.5, in cui però viene omessa la necessità di classificare composti preparati o miscele con frasi di rischio R52 ed R52-53, di fatto eliminando la nocività a lungo termine.

Il grande cambiamento che veniva auspicato, prima della Legge n. 28/2012 (2), e che si concretizza con l'applicazione alla classificazione dell'Accordo ADR risiede in questo ultimo punto solo apparentemente marginale e residuale.

L'aver trovato un metodo solo all'apparenza più semplice e vantaggioso, per la classificazione dei rifiuti, che riesca a tagliare parte dei contributi di quelle sostanze che in letteratura danno un contributo più pesante in seno alla classificazione, all'atto di emissione della Legge 28/2012, veniva plaudito dai più, coinvolti nel processo di gestione dei rifiuti anche pericolosi, tralasciando quelle che sono le ricadute invece più durature di questo ennesimo cambiamento normativo.

Quanto appena detto, circa l'applicazione dell'H14 "Ecotossico" ai rifiuti con l'utilizzo dell'Accordo ADR, comporta sempre e comunque la caratterizzazione completa del rifiuto individuandovi tutte le sostanze presenti, forme metalliche comprese, e dovendo determinare anche BCF (*Bio-Concentration Factor*) e K_{ow} , (coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua) risultando di fatto inapplicabili i Principi Ponte (prima parte del punto 3 citato) enunciati nell'ADR, vista la grande variabilità dei rifiuti prodotti.

Qualora si applichino i metodi della sommatoria enunciati nell'ADR, l'obbligo, secondo questo dispositivo, di dover comunque tener conto anche dei fattori moltiplicativi (i cosiddetti Fattori M per le singole sostanze) – che peraltro saranno obbligatori con l'entrata in vigore definitiva del CLP il 1° giugno del 2015 anche per le miscele – renderà più complesso e gravoso l'utilizzo dell'Accordo ADR ai rifiuti, facendo pesare in modo più consistente, sostanze prima non prese in considerazione, perché semmai al di sotto dei *cut-off*, proprio nei calcoli delle miscele cui si assimilano, di base, i rifiuti.

Qualora poi, per l'impossibilità di approfondire oltre un certo limite la caratterizzazione di un rifiuto a composizione non nota, si utilizzi l'opzione di classificare *ex novo* secondo i dettami del CLP ciò comporta l'utilizzo della terna di saggi biologici su Daphnie, pesci ed alghe come specificato nel Regolamento (CE) 440/2008 che risulta sostituire gli allegati che definiscono le prove da effettuare ai sensi del CLP medesimo.

I risvolti pratici sin qui emersi su questo percorso di caratterizzazione risultano nelle seguenti criticità rilevate dalla platea degli operatori:

1. parlando di rifiuti non è chiara e condivisa a livello trans-nazionale quale possa essere la metodica per produrre l'eluato su cui testare con test *in vivo* il rifiuto: specialmente per alcune tipologie di rifiuto può diventare estremamente difficoltoso produrre un eluato (un esempio per tutti i RAEE (Rifiuti da Apparecchiature Elettriche ed Elettroniche): non vi è di fatto una metodologia condivisa e standardizzata di ingresso alla valutazione ecotossicologica del rifiuto;
2. la sperimentazione animale su vertebrati è ormai disincentivata a livello comunitario;
3. i costi e i tempi dell'onere di caratterizzazione da parte del produttore lievitano considerevolmente e risultano non compatibili con le tempistiche di gestione dei rifiuti e dei relativi stoccaggi e depositi temporanei;
4. nella pratica sul territorio nazionale non vi sono un numero sufficiente di laboratori che possano espletare tali analisi per una platea così vasta come quella dei produttori di rifiuti e non solo per quella dei produttori *ex novo* di sostanze da testare per l'immissione al commercio, imballaggio etichettatura e trasporto.

Ricordiamo che l'utilizzo dei test normati dal Regolamento CLP (8) per la sperimentazione delle sostanze, avendo una logica *in vitro* – quella dell'immissione in un circuito commerciale e di fruizione di beni e sostanze – confliggono pesantemente con gli indirizzi circa la sperimentazione animale a partire dalla oramai storica Direttiva 86/609/CEE “concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati membri relative alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici” (41), sino a tutte le normazioni comunitarie che si succedute a partire da questa e di cui l'ISS si fa da sempre promotore, con l'implementazione di soluzioni alternative ed aggiornamenti continui delle metodiche sperimentali innovative ed alternative, nell'ottica della difesa delle specie animali.

Inoltre, tali test si potrebbero di fatto applicare, stabilita una norma univoca per la produzione di eluato, solo per quella parte di rifiuti che sono campionabili secondo norme acclamate nel mondo di gestione dei rifiuti quali la Norma UNI 10802:2004 “Rifiuti liquidi, granulari, pastosi e fanghi. Campionamento manuale e preparazione ed analisi degli eluati”, rimanendo esclusi tutta una serie di rifiuti su cui la discussione è ancora completamente aperta quali ad esempio i già citati Rifiuti rappresentati da articoli e/o manufatti.

Di fatto le nuove modalità di classificazione secondo l'Accordo ADR rappresentano ad una prima lettura superficiale un innalzamento generico dei valori limite per l'attribuzione della caratteristica di pericolo H14 ai rifiuti, ma di fatto pongono la gravissima problematica di come applicare i fattori M, nell'attesa della stesura di un provvedimento ministeriale ad hoc che disciplini la materia in maniera specifica ed indipendente.

Si spera che questo provvedimento rappresenti una nuova opportunità per riprendere la via che si era intrapresa in precedenza, comunque reintroducendo la nocività a lungo termine, peraltro contenuta nella definizione stessa della caratteristica di Pericolo H14 “Ecotossico”, nonché la possibilità di percorrere la via, eventualmente preferenziale, dei saggi biologici su specie tassonomiche diverse, e non solo quelle individuate da batteri, crostacei ed alghe nel

rispetto delle norme comunitarie relative alla minimizzazione della sperimentazione animale a partire dalla Direttiva 86/609/CEE (41), e sostenibili sia economicamente, nel contesto della caratterizzazione del rifiuto, che nella fattività di pratiche di laboratorio che eventualmente si incrementerebbero esponenzialmente, per ovvi motivi di mercato.

A tal proposito si ricorda che il citato Parere ISS/ISPRA aveva suggerito una terna, solo per test su eluato secondo la UNI EN 14735:2005, nella più ampia gamma proposta dalla letteratura internazionale sui test efficaci, già riportati in precedenza, ed attuabili su fattispecie solide e liquide relative alle principali tipologie di rifiuti da indagare, per la caratterizzazione richiesta su H14, e che derivava dagli esiti di un Ring-Test internazionale.

Attualmente presso l'ISS è in atto una ricerca mirata per la sperimentazione, su di un ampio spettro di specie tassonomiche diverse al fine della valutazione dell'efficacia di almeno una terna di test ecotossicologici da applicare alla caratterizzazione dei rifiuti anche a composizione ignota, che soddisfi i seguenti requisiti:

- tempistiche congrue per esecuzione/robustezza della risposta;
- utilizzo di metodi/test riconosciuti a livello internazionale: utilizzo di test OECD;
- superamento della terna del CLP (8) perché congrua solo per sostanze e preparati ma non mutuabile realisticamente al mondo dei rifiuti;
- congruenza con i dettami sulle Direttive per la protezione delle specie animali nella ricerca con il pieno rispetto ed adeguamento alla questione etica;
- valutazione degli effetti e dell'impatto su tutti i livelli della catena trofica;
- superamento della valutazione strettamente chimica delle sostanze contenute nel rifiuto, privilegiando l'effetto prodotto sull'ambiente limitatamente alla stima della caratteristica di Pericolo H14 "Ecotossico".

La reale ed efficace tutela della salute umana e dell'ambiente e la sua sostenibilità non può comunque non tener conto, da una parte dell'efficacia di un metodo diretto come quello della analisi biologica rifiuto-specifica, dall'altra della differenziazione da una normativa come quella del Regolamento CLP (8) il cui intento principe è ben altro, ed oramai sta divenendo un abito stretto nell'applicazione pedissequa al mondo dei rifiuti, per i quali di volta in volta si dovrebbe scegliere un approccio più pragmatico e sostenibile, senza però mai rinunciare, da un lato alla efficacia del risultato e dall'altro sulle plausibili implicazioni pratiche e realmente praticabili per lo smaltimento ed il conferimento in impianti autorizzati.

Bibliografia

1. Italia. Decreto Legislativo n. 152 del 3 aprile 2006 "Norma Ambientale". *Gazzetta Ufficiale* n. 88 del 14 aprile 2006.
2. Italia. Legge n. 28 del 24 marzo 2012: "Conversione in legge, con modificazioni, del decreto legge 25 gennaio 2012, n. 2, recante misure straordinarie e urgenti in materia ambientale". *Gazzetta Ufficiale* n. 71 del 24 marzo 2012.
3. Italia. Decreto Legislativo n. 205 del 03 dicembre 2010, "Disposizioni di attuazione della direttiva 2008/98/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 19 novembre 2008 relativa ai rifiuti e che abroga alcune direttive." *Gazzetta Ufficiale - Supplemento Ordinario* n. 288 del 10 dicembre 2010.
4. United Nations. *ADR (applicable as from 1 January 2011). European Agreement concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Road*. New York, Geneva: United Nations; 2010.
5. Europa. Direttiva n. 67/548/CEE del Consiglio del 27 giugno 1967 concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* n. 196 del 16 agosto 1967.

6. Europa. Direttiva 1999/45/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 31 maggio 1999, concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati membri relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura dei preparati pericolosi. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* n. L 200/1 del 30 luglio 1999;
7. Europa. Decisione della Commissione 2000/532/CE del 3 maggio 2000. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* n. L 226 del 6 settembre 2000.
8. Europa. Regolamento CE N. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* n. L 353/1 del 31 dicembre 2008.
9. Europa. Direttiva 2008/98/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 19 novembre 2008 relativa ai rifiuti e che abroga alcune direttive. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* n. L 312/3 del 22 novembre 2008.
10. Italia. Decreto Legislativo n. 260 del 28 luglio 2004. Disposizioni correttive ed integrative del decreto legislativo 14 marzo 2003, n. 65, concernente la classificazione, l'imballaggio e l'etichettatura dei preparati pericolosi. *Gazzetta Ufficiale* n. 260 *Supplemento Ordinario* n. 163/L del 5 novembre 2004.
11. Italia. Decreto del Ministero della Salute del 3 aprile 2007. Attuazione della direttiva n. 2006/8/CE della Commissione del 23 gennaio 2006, che modifica, per adeguarli al progresso tecnico, gli allegati II, III e V della direttiva 1999/45/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative degli Stati membri, relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura dei preparati pericolosi. *Gazzetta Ufficiale* n. 87 del 14 aprile 2003;
12. Italia. Decreto del Ministero della Salute del 5 maggio 2008. Modifiche al decreto 3 aprile 2007 di recepimento della direttiva 2006/8/CE, relativo alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura dei preparati pericolosi. *Gazzetta Ufficiale* n. 173 del 25 luglio 2008;
13. Europa. Direttiva 2008/58/CE della Commissione del 21 agosto 2008 recante trentesimo adeguamento al progresso tecnico della direttiva 67/548/CEE del Consiglio concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 246 del 15 settembre 2008.
14. Europa. Direttiva 2009/2/CE della Commissione del 21 agosto 2008 recante trentunesimo adeguamento al progresso tecnico della direttiva 67/548/CEE del Consiglio concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 11/6 del 16 gennaio 2009.
15. Europa. Regolamento (CE) N. 790/2009 della Commissione del 10 agosto 2009 recante modifica, ai fini della adeguamento al progresso tecnico e scientifico, del regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze e delle miscele. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 235/1 del 5 settembre 2009.
16. Europa. Regolamento (UE) N. 286/2011 della Commissione del 10 marzo 2011 recante modifica, ai fini della adeguamento al progresso tecnico e scientifico, del regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze e delle miscele. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 83/1 del 30 marzo 2011.
17. Italia. Decreto Ministero della Salute del 28 febbraio 2006. *Supplemento Ordinario alla Gazzetta Ufficiale* n. 100 del 20 aprile 2006.
18. Italia. Decreto del Ministero della Salute del 3 aprile 2007. Attuazione della direttiva n. 2006/8/CE della Commissione del 23 gennaio 2006, che modifica, per adeguarli al progresso tecnico, gli allegati II, III e V della direttiva 1999/45/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, concernente il

ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative degli Stati membri, relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura dei preparati pericolosi. *Gazzetta Ufficiale* n. 96 del 26 aprile 2007.

19. Italia. Decreto Legislativo n. 65 del 14 marzo 2003. Attuazione della direttiva 1999/45/CE e della direttiva 2001/60/CE relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura dei preparati pericolosi. *Gazzetta Ufficiale* n. 87 del 14 aprile 2003.
20. Istituto Superiore di Sanità, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale. *Parere ISPRA/ISS sulla classificazione dei rifiuti ai fini dell'attribuzione della caratteristica di pericolo H14 "Ecotossico"*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011. (Prot. n. 40832 del 29/09/2011). Disponibile all'indirizzo: http://www.iss.it/binary/ampp/cont/Ecotx_rf.pdf; ultima consultazione 15/12/14.
21. Italia Legge n. 13 del 27 febbraio 2009. Conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 30 dicembre 2008, n. 208, recante misure straordinarie in materia di risorse idriche e di protezione dell'ambiente. *Gazzetta Ufficiale* n. 49 del 28 febbraio 2009.
22. Italia. Decreto del Ministro dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare del 7 novembre 2008. Disciplina delle operazioni di dragaggio nei siti di bonifica di interesse nazionale, ai sensi dell'articolo 1, comma 996, della legge 27 dicembre 2006, n. 296. *Gazzetta Ufficiale* n. 284 del 4 dicembre 2008.
23. Italia. Decreto Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare del 4 agosto 2010. Modifica della tabella A2, dell'allegato A del decreto ministeriale 7 novembre 2008, relativo alla disciplina delle operazioni di dragaggio nei siti di bonifica di interesse nazionale. *Gazzetta Ufficiale* n. 187 del 12 agosto 2010.
24. Italia. Decreto Legislativo n. 260 del 28 luglio 2004. Disposizioni correttive e integrative del decreto legislativo 14 marzo 2003, n. 65, concernente la classificazione, l'imballaggio e l'etichettatura dei preparati pericolosi. *Supplemento Ordinario* n. 163/L alla *Gazzetta Ufficiale* n. 260 del 5 novembre 2004.
25. UNI EN 14735:2005. *Caratterizzazione dei rifiuti: Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2005.
26. UNI EN 124570-2:2004. *Lisciviazione - Prova di conformità per la lisciviazione di rifiuti granulari e di fanghi Parte 2: Prova a singolo stadio, con un rapporto liquido/solido di 10 l/kg, per materiali con particelle di dimensioni minori di 4 mm (con o senza riduzione delle dimensioni)*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione. 2004.
27. UNI EN ISO 6341:1999. *Qualità dell'acqua: Determinazione dell'inibizione della mobilità della Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) Prova di tossicità acuta*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 1999.
28. UNI EN ISO 11348-1:2001 *Qualità dell'acqua: Determinazione dell'effetto inibitorio di campioni acquosi sull'emissione di luce di Vibrio fischeri (prova su batteri luminescenti) Metodo con batteri preparati di fresco*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2001.
29. UNI EN ISO 11348-2:2001 *Qualità dell'acqua: Determinazione dell'effetto inibitorio di campioni acquosi sull'emissione di luce di Vibrio fischeri (prova su batteri luminescenti). Metodo con batteri gelificati*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2001.
30. UNI EN ISO 11348-3:2001 *Qualità dell'acqua: Determinazione dell'effetto inibitorio di campioni acquosi sull'emissione di luce di Vibrio fischeri (prova su batteri luminescenti). Metodo con batteri liofilizzati*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2001.
31. UNI EN ISO 8692:2005. *Qualità dell'acqua: Prova di inibizione della crescita di alghe d'acqua dolce per mezzo di alghe verdi unicellulari*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2005.
32. UNI 10802:2004. *Rifiuti: Rifiuti liquidi, granulari, pastosi e fanghi. Campionamento manuale e preparazione ed analisi degli eluati*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2004.

33. EPA. *Microtox Application Notes: M 103-116*. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, 1979.
34. McFeters GA, Bond PJ, Olson SB, Tchan YT. A comparison of microbial bioassays for the detection of aquatic toxicants. *Water Research* 1983;17(12):1757-62.
35. UK Environment Agency. *Classify different types of waste*. Rotherham: Environment Agency. Disponibile all'indirizzo: <https://www.gov.uk/how-to-classify-different-types-of-waste>; ultima consultazione 15/12/14.
36. Umwelt Bundes Amt. *H14 Ring Test*. Dessau-Roßlau: Umwelt Bundes Amt; 2007. Disponibile all'indirizzo: <http://ecotoxwasteringtest.uba.de/h14/index.jsp>; ultima consultazione 15/12/14.
37. Moser H, Römbke J. *Ecotoxicological characterisation of waste – Results and experiences of an European ring test*. New York: Springer Ltd; 2009.
38. Moser H, Roembke J, Donnevert G, Becker R. Evaluation of biological methods for a future methodological implementation of the Hazard criterion H14 “ecotoxic” in the European waste list (2000/532/EC). *Waste Management & Research* 2011;29:180-7.
39. Pandard P, Devillers J, Charissou AM, Poulsen V, Jourdain MJ, Féraud JF, Grand C, Bispo A. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Sci Total Environ* 2006;363(1-3):114-25.
40. Wilke BM, Riepert F, Koch C, Kühne T. Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. *Ecotoxicol Environ Saf* 2008;70(2):283-93.
41. Europa. Direttiva del Consiglio n. 86/609/CEE del 26 novembre 1986 “Concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati membri relative alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici” e successive implementazioni. *Gazzetta ufficiale delle Comunità Europee* L 358 del 18 dicembre 1986.

CLASSIFICAZIONE DEI RIFIUTI: LINEE GUIDA OECD E BUONA PRATICA DI LABORATORIO

Emanuela Testai

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Ogniquale volta una qualsiasi sostanza chimica o una miscela debba essere immesse sul mercato deve essere avviato preventivamente un processo di valutazione della sicurezza d'uso da parte dell'autorità competente. Tale valutazione si basa sui dati prodotti dal responsabile della sostanza contenuti in un fascicolo tecnico generalmente indicato come dossier. L'entità del dossier varia in relazione alla specificità e alla destinazione d'uso del prodotto (es. antiparassitario, farmaco, additivo alimentare) e/o del suo tonnellaggio (come previsto dal Regolamento (CE) 1907/2006, noto come REACH dall'inglese *Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals*). Le richieste regolatorie in base alle quali vengono preparati i dossier per i vari campi di impiego sono indicate in specifiche direttive europee o regolamenti, quali Regolamento (CE) 1223/2009 per i cosmetici, Regolamento (CE) 1107/2009 per i pesticidi, Regolamento (CE) 528/2012 per i biocidi, Regolamento (CE) 1907/2006.

Le sostanze o gli oggetti che derivano da attività umane o da cicli naturali, di cui il detentore si disfi o abbia deciso o abbia l'obbligo di disfarsi, sono definiti rifiuti. Vengono classificati secondo l'origine, in rifiuti urbani e rifiuti speciali, e, secondo le caratteristiche in rifiuti pericolosi e non pericolosi.

Classificazione dei rifiuti pericolosi

La Direttiva europea 2008/98/CE (recepita in Italia con il DL.vo 3 dicembre 2010, n. 205) regola aspetti relativi alla classificazione dei rifiuti pericolosi, facendo salva la Decisione 2000/532/CE che contiene il catalogo dei rifiuti. Il principio adottato dalla direttiva si basa sul fatto che la presenza di qualsiasi sostanza pericolosa ai sensi della Direttiva 67/548/CEE in una certa concentrazione nel rifiuto fa scattare la classificazione di rifiuto pericoloso. La Direttiva 2008/98/CE quindi continua a far riferimento alla Direttiva 67/548/CEE anziché al Regolamento (CE) 1272/2008 in materia di classificazione, etichettatura e imballaggio delle sostanze e preparati pericolosi (noto come Regolamento CLP: *Classification, Labelling and Packaging*) emanato lo stesso anno della Direttiva 2008/98/CE ma entrato in vigore a gennaio 2010, che adotta i criteri del GHS (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*).

Il Regolamento CLP introduce in Europa il nuovo sistema di classificazione, etichettatura e imballaggio delle sostanze e delle miscele pericolose abrogando le Direttive 67/548/CEE (classificazione ed etichettatura delle sostanze pericolose) e 1999/45/CE (classificazione ed etichettatura dei preparati) alla fine di un periodo transitorio (fino a giugno 2015) durante il quale saranno applicabili sia il sistema vecchio che il nuovo.

Questo regolamento si applica a tutte le sostanze chimiche e le miscele. I rifiuti sono esclusi dal campo di applicazione insieme a farmaci, dispositivi medici, alimenti, mangimi, cosmetici

(prodotto finito), intermedi non isolati, sostanze/miscele radioattive o usate per ricerca e sviluppo (e perciò non immesse sul mercato). Tuttavia, nonostante l'esclusione esplicita dei rifiuti, la definitiva abrogazione della Direttiva 67/548/CEE alla fine del periodo transitorio sicuramente inciderà anche sulla classificazione dei rifiuti, facendo presupporre la necessità di un nuovo intervento normativo per adattare le attuali caratteristiche di pericolo ai nuovi criteri di classificazione, con possibile modifica della classificazione del rifiuto.

I principi di classificazione previsti dal Regolamento CLP per la definizione del pericolo di una certa sostanza sono sostanzialmente gli stessi della Direttiva 67/548/CEE, ma le classi e le categorie di pericolo hanno subito alcune variazioni. Ad esempio, nel settore della identificazione dei pericoli chimico-fisici le cinque classi di pericolo della direttiva sono state sostituite da sedici classi introdotte dal regolamento CLP.

Relativamente alla identificazione dei pericoli per la salute umana, sono state inserite nuove classi (es. tossicità specifica per gli organi bersaglio ad esposizione singola e ripetuta) e sono cambiati i nomi delle classi che identificano le sostanze Cancerogene, Mutagene e tossiche per la Riproduzione (CMR) secondo lo schema riportato in Tabella 1 relativo ai cancerogeni.

Tabella 1. Classificazione dei cancerogeni secondo la Direttiva 67/548/CEE e il nuovo Regolamento CLP

Vecchia classe (Dir. 67/548/CEE)	Nuova classe (CLP)
1	1a
2	1b
3 (con soglia)	2

Quindi, fino a che saranno in vigore i due sistemi, sarà necessario sapere a quale regime di classificazione ci si riferisce, soprattutto per le CMR di classe 2. Infatti nel caso delle altre classi non è possibile fare confusione, essendo presenti solo in uno dei due sistemi, ma nella nuova classe 2 secondo il CLP sono compresi i cancerogeni per i quali è stato definito un meccanismo di azione non genotossico, e che quindi presentano una soglia al di sotto della quale non si ha formazione del tumore (precedentemente compresi nella classe 3). Il tipo di valutazione del rischio per i cancerogeni con soglia è diverso da quello adottato per i cancerogeni compresi nelle altre classi e quindi questo punto merita particolare attenzione.

Una ulteriore differenza riguarda le frasi R, ma la classificazione di pericolosità nel caso dei rifiuti, diversamente dal caso dei preparati, richiede la valutazione delle sole caratteristiche di pericolo (H) ai fini della classificazione di pericolosità, secondo quanto descritto in Tabella 2.

Quando sostanze o miscele sono classificate ed etichettate dal responsabile dell'immissione in commercio (o della produzione nel caso dei rifiuti) ciò avviene in regime di autoclassificazione. Per poter condurre una valutazione che porti alla auto-classificazione delle miscele sono stati definiti alcuni criteri:

1. Si possono utilizzare dati sperimentali ricavati da test effettuati direttamente sulla miscela tal quale.
2. Si possono applicare dei Principi Ponte (*bridging principles*) basati sulla "somiglianza" nella composizione della miscela da classificare con una miscela a composizione nota già classificata in base a risultati di saggi sperimentali.
3. Si può ricorrere al metodo di calcolo, che si basa sulla composizione quali-quantitativa delle miscele, applicando le formule di calcolo per gli effetti cosiddetti "additivi" (es. irritazione, tossicità) e i limiti di concentrazione generici o specifici negli altri casi.

Tabella 2. Descrizione delle classi di pericolo H utilizzate per i rifiuti

Classe di pericolo	Definizione
H1 "Esplosivo"	Sostanze e preparati che possono esplodere per effetto della fiamma o che sono sensibili agli urti e agli attriti più del dinitrobenzene;
H2 "Comburente"	Sostanze e preparati che, a contatto con altre sostanze, soprattutto se infiammabili, presentano una forte reazione esotermica;
H3-A "Facilmente infiammabile"	Sostanze e preparati: liquidi il cui punto di infiammabilità è inferiore a 21°C (compresi i liquidi estremamente infiammabili), o che a contatto con l'aria, a temperatura ambiente e senza apporto di energia, possono riscaldarsi e infiammarsi, o solidi che possono facilmente infiammarsi per la rapida azione di una sorgente di accensione e che continuano a bruciare o a consumarsi anche dopo l'allontanamento della sorgente di accensione, o gassosi che si infiammano a contatto con l'aria a pressione normale, o che a contatto con l'acqua o l'aria umida, sprigionano gas facilmente infiammabili in quantità pericolose
H3-B "Infiammabile"	Sostanze e preparati liquidi il cui punto di infiammabilità è pari o superiore a 21°C e inferiore o pari a 55°C
H4 "Irritante"	Sostanze e preparati non corrosivi il cui contatto immediato, prolungato o ripetuto con la pelle o le mucose può provocare una reazione infiammatoria
H5 "Nocivo"	Sostanze e preparati che, per inalazione, ingestione o penetrazione cutanea, possono comportare rischi per la salute di gravità limitata;
H6 "Tossico"	Sostanze e preparati (comprese le sostanze e i preparati molto tossici) che, per inalazione, ingestione o penetrazione cutanea, possono comportare rischi per la salute gravi, acuti o cronici e anche la morte;
H7 "Cancerogeno"	Sostanze e preparati che, per inalazione, ingestione o penetrazione cutanea, possono produrre il cancro o aumentarne la frequenza
H8 "Corrosivo"	Sostanze e preparati che, a contatto con tessuti vivi, possono esercitare su di essi un'azione distruttiva;
H9 "Infettivo"	Sostanze contenenti microrganismi vitali o loro tossine, conosciute o ritenute per buoni motivi come cause di malattie nell'uomo o in altri organismi viventi;
H10 "Teratogeno"	Sostanze e preparati che, per inalazione, ingestione o penetrazione cutanea, possono produrre malformazioni congenite non ereditarie o aumentarne la frequenza;
H11 "Mutageno"	Sostanze e preparati che, per inalazione, ingestione o penetrazione cutanea, possono produrre difetti genetici ereditari o aumentarne la frequenza;
H12	Sostanze e preparati che, a contatto con l'acqua, l'aria o un acido, sprigionano un gas tossico o molto tossico;
H13	Sostanze e preparati suscettibili, dopo eliminazione, di dare origine in qualche modo ad un'altra sostanza, ad esempio ad un prodotto di lisciviazione avente una delle caratteristiche sopra elencate;
H14 "Ecotossico"	Sostanze e preparati che presentano o possono presentare rischi immediati o differiti per uno o più settori dell'ambiente.

La Direttiva 2008/98/CE per determinare la pericolosità del rifiuto si riferisce al sistema di calcolo secondo il quale per le caratteristiche da H3 a H8, H10 e H11 si applicano i limiti di concentrazione indicati all'articolo 2 della decisione 2000/532/CE (Tabella 3).

Il sistema di calcolo, anche se non comporta attività sperimentale per la determinazione degli eventuali effetti (irritante, corrosivo, tossico, ecc.) presuppone 1) di conoscere la composizione quali/quantitativa, derivata essenzialmente dal ciclo produttivo e/o di consumo che ha generato il rifiuto; 2) di poter fare ragionevoli ipotesi sulla produzione di possibili prodotti di reazione/trasformazione e 3) sulla assenza di fenomeni di interazione.

Tabella 3. Caratteristiche che determinano la classificazione dei rifiuti come pericolosi in riferimento ai codici da H3 a H8 e ai codici H 10 e H 11 (*)

Caratteristica	Valore soglia
Punto di infiammabilità	< 55°C,
Una o più sostanze classificate come molto tossiche in concentrazione totale	> 0,1%
Una o più sostanze classificate come tossiche in concentrazione totale	> 3%
Una o più sostanze classificate come nocive in concentrazione totale	> 25%
Una o più sostanze corrosive classificate come R35 in concentrazione totale	> 1%
Una o più sostanze corrosive classificate come R34 in concentrazione totale	> 5%
Una o più sostanze irritanti classificate come R41 in concentrazione totale	> 10%
Una o più sostanze irritanti classificate come R36, R37, R38 in concentrazione totale	> 20%
Una sostanza riconosciuta come cancerogena (categorie 1 o 2) in concentrazione totale	> 0,1%
Una sostanza riconosciuta come cancerogena (categoria 3) in concentrazione totale	> 0,1%,
Una sostanza riconosciuta come tossica per il ciclo riproduttivo (categorie 1 o 2) classificata come R60 o R61 in concentrazione totale	> 0,5%,
Una sostanza riconosciuta come tossica per il ciclo riproduttivo (categoria 3) classificata come R62 o R63 in concentrazione totale	> 5%,
Una sostanza riconosciuta mutagena (categoria 1 o 2) classificata come R46 in concentrazione totale	> 0,1%
Una sostanza riconosciuta mutagena (categoria 3) classificata come R68 in concentrazione totale	> 1%

(*) Per la classificazione delle sostanze CMR ci si riferisce ancora alla classificazione prevista dalla Dir. 67/548/CEE e non al CLP.

Vale la pena di sottolineare che nel sistema di classificazione dei rifiuti non si tiene conto dell'approccio basato sulla 'diluizione dell'effetto', adottato dalla direttiva sui preparati pericolosi per il calcolo degli effetti locali (corrosivo/irritazione), effetti acuti letali e ambientali. Tuttavia, oltre al sistema di calcolo la Direttiva 2008/98/CE introduce anche nel campo dei rifiuti la possibilità di saggiare sperimentalmente la miscela e di classificarla in base ai risultati ottenuti. Fa, infatti, un esplicito riferimento ai criteri, ma anche ai metodi utilizzati per la classificazione delle sostanze e dei preparati pericolosi; ad esempio, per i rifiuti con un valore estremo del pH (≤ 2 oppure $\geq 11,5$) per i quali non sia già stata identificata una concentrazione di sostanze corrosive superiori ai limiti, secondo la Commissione Europea:

“Il pH estremo prevale non solo rispetto al risultato derivante dal metodo di calcolo basato sui limiti percentuali generici assegnati alle categorie di pericolo delle sostanze costituenti il preparato, ma anche rispetto ai limiti specifici eventualmente assegnati alle singole sostanze. Quindi, anche se il limite specifico porterebbe ad una classificazione meno severa, se il pH è ≤ 2 oppure $\geq 11,5$ comunque si classifica C R35, a meno che non si decida di confutare questa classificazione con la determinazione della riserva acida/alcalina, alla quale deve poi seguire il test *in vitro*”.

Un risultato positivo di corrosione *in vitro* porta all'applicazione della classificazione di corrosivo, mentre un risultato negativo non esclude la possibilità che il rifiuto esibisca comunque caratteristica di irritante e quindi è richiesto un test di irritazione *in vitro*. Ma quali metodi possono essere utilizzati?

Nelle NOTE dell'Allegato III della Direttiva 2008/98/CE è riportato che:

1. L'attribuzione delle caratteristiche di pericolo 'tossico' (e 'molto tossico'), 'nocivo', 'corrosivo', 'irritante', 'cancerogeno', 'tossico per la riproduzione', 'mutageno' ed 'ecotossico' è effettuata secondo i criteri stabiliti nell'allegato VI della direttiva 67/548/CEE del Consiglio, del 27 giugno 1967, concernente il ravvicinamento delle

disposizioni legislative, regolamentari e amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose.

2. Ove pertinente si applicano i valori limite di cui agli allegati II e III della direttiva 1999/45/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 31 maggio 1999 concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati membri relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura dei preparati pericolosi.

È inoltre riportato che i metodi da utilizzare sono descritti nell'allegato V della Direttiva 67/548/CEE e in altre pertinenti note del CEN (Comitato Europeo di Normazione), e un organismo che, su mandato della CE, trasforma i requisiti previsti dalla legge in norme tecniche. In Italia le norme tecniche sono recepite dall'UNI - Ente Nazionale Italiano di Unificazione; ad esempio, al campionamento dei rifiuti per le analisi di laboratorio si applica la norma UNI 10802: 2013 (Rifiuti - Campionamento manuale, preparazione del campione e analisi degli eluati) entrata in vigore il 06 agosto 2013.

La norma descrive:

- il processo di definizione di un piano di campionamento
- tecniche di campionamento manuale di rifiuti liquidi, granulari, pastosi, grossolani, mono-litici e fanghi in relazione al loro diverso stato fisico e conservazione a breve termine;
- procedure di riduzione delle dimensioni dei campioni dei rifiuti prelevati in campo, al fine di facilitarne il trasporto in laboratorio;
- documentazione per la rintracciabilità delle operazioni di campionamento;
- procedure per l'imballaggio, la conservazione, lo stoccaggio del campione a breve termine e il trasporto dei campioni di rifiuti;
- procedure di riduzione delle dimensioni dei campioni per le analisi;
- procedimenti di preparazione e analisi degli eluati.

Per tutti gli *end-point* di tipo tossicologico i metodi da utilizzare sono descritti in quello che era l'allegato V della Direttiva 67/548/CEE. Tuttavia tale allegato è stato sostituito ai fini del REACH dal Regolamento (CE) 440/2008 sui metodi di prova, successivamente integrato con il Regolamento (CE) 761/2009 (adeguamento tecnico). Il Regolamento (CE) 440/2008 costituisce oggi la normativa di riferimento per la scelta dei metodi di prova da adottare per la classificazione delle sostanze chimiche e conseguentemente anche dei rifiuti.

I metodi sopra citati sono totalmente sovrapponibili con i metodi descritti dalle linee guida dell'OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development* o OCSE, Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico).

Linee guida OECD e l'applicazione dei principi della BPL ai rifiuti

L'OECD è una organizzazione intergovernativa che riunisce i rappresentanti di 34 Paesi di Nord e Sud America, Europa e area del Pacifico. Uno degli obiettivi di questa organizzazione è quello di trovare risposte a problematiche di mutuo interesse, quanto più possibile coordinate e armonizzate, in modo da favorire gli scambi commerciali. Per questo motivo l'OECD ha sviluppato il Programma per la Salute e la Sicurezza Ambientale (*Environmental Health and Safety Programme*), nell'ambito del quale si svolge un considerevole lavoro correlato alla "sicurezza chimica", tra cui la pubblicazione di una serie di linee guida (*Test Guidelines*, TG),

in cui vengono descritti metodi utilizzati per l'identificazione di pericolo associato all'esposizione a sostanze chimiche e i *Guidance Document*, in cui vengono raccolti una serie di dettagli tecnico-scientifici utili per la conduzione dei singoli test. Questi metodi sono considerati uno standard di riferimento nell'ambito della valutazione di sicurezza delle sostanze chimiche e, spaziando dalle proprietà chimico-fisiche agli effetti sulla salute umana e ambientale, coprono l'intero spettro dei test richiesti dalle Autorità regolatorie nei dossier tossicologici ed ecotossicologici per la commercializzazione dei prodotti chimici.

La pubblicazione delle TG (originariamente 51) è iniziata nel 1981. Al momento attuale, oltre a numerosi *Guidance Document*, sono presenti circa 100 TG reperibili e scaricabili gratuitamente in formato pdf dal sito web dell'OECD (<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>). Ciascuna TG riporta il principio del metodo, il campo di applicazione e gli eventuali limiti, descrive dettagliatamente la procedura sperimentale da seguire, dà informazioni su come il dato debba essere riportato e sulla sua interpretazione.

Lo scopo delle TG, strettamente correlate al sistema della Buona Pratica di Laboratorio (BPL), è quello di assicurare la produzione di dati armonizzati e di qualità, che possano essere riconosciuti come validi da tutti gli Stati membri dell'OECD. Il principio del Mutuo Riconoscimento dei Dati (MAD) evita la duplicazione dei test, inutile dal punto di vista scientifico e dispendiosa in termini economici, riducendo inoltre il numero di animali da esperimento utilizzati. Allo stesso modo sono facilitati gli scambi commerciali tra gli Stati membri, fermo restando il principio di sicurezza per la salute dell'uomo e per l'ambiente.

La BPL costituisce un sistema di regole in grado di assicurare la qualità delle procedure e delle condizioni cui studi preclinici sono programmati, svolti, registrati, comunicati e conservati per valutare gli effetti sulla salute dell'uomo e dell'ambiente. L'insieme delle regole di questo sistema stabilisce quindi come condurre uno studio, partendo dalla sua pianificazione fino alla comunicazione dei risultati (*reporting*) e alla loro conservazione in archivi controllati. Uno dei principi fondanti della BPL è che i dati generati durante uno studio, le rispettive documentazioni e le relazioni finali devono essere redatti in modo da consentire la ricostruzione corretta degli eventi relativi allo studio anche a distanza di anni. In altre parole deve essere garantita la totale tracciabilità del dato, lo studio deve essere condotto in completa trasparenza e onestà e deve essere assicurata la riservatezza del dato ottenuto.

In Italia è il DL.vo n. 50 del 2 marzo 2007 che legifera in materia di BPL; nei suoi due allegati si trovano nel dettaglio tutte le caratteristiche che rendono idonei gli studi e i laboratori (o Centri di Saggio, CdS) a svolgere studi conformi ai principi di BPL. La gestione del sistema BPL è materia di competenza del Ministero della Salute (Dipartimento della Prevenzione) presso cui è stata istituita una Unità di Monitoraggio (UM) della Buona Pratica di Laboratorio (http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_4.jsp?lingua=italiano&area=buona%20pratica%20laboratorio). Le ispezioni per l'attivazione di un CdS e/o per il rinnovo dalla certificazione vengono condotte ogni due anni ad opera di personale qualificato incluso in un Decreto Ministeriale recante una lista di Ispettori individuato tra personale nei ruoli del Ministero della Salute e dell'Istituto Superiore di Sanità.

La richiesta di certificazione avviene su base volontaria da parte di ciascun CdS che operi in settori previsti dal campo di applicazione della BPL, che è chiaramente indicato nel DL.vo 50/2007:

“I principi di BPL si applicano a tutti gli studi non clinici sulla sicurezza per la salute umana e per l'ambiente resi obbligatori dalla normativa in materia di registrazione e licenze di prodotti farmaceutici, antiparassitari, additivi per mangimi ed alimenti, prodotti cosmetici, medicinali ad uso veterinario e prodotti analoghi e da quella sui prodotti chimici”.

Secondo questo principio rientrano nel campo di applicazione tutti gli studi di sicurezza che devono essere forniti ad una Autorità Regolatoria competente per la registrazione o notifica di una sostanza (farmaco, pesticida, biocida, prodotto chimico, ecc.) e ogniqualvolta sia espressamente richiesto da norme vigenti. Perciò nessuno studio può essere condotto in BPL su base volontaria senza una specifica richiesta regolatoria.

Per i rifiuti al momento attuale non c'è alcuna richiesta regolatoria nelle Direttive vigenti che imponga al responsabile della auto-classificazione dei rifiuti di svolgere gli studi sperimentali in conformità alla BPL. Perciò l'assenza di richiesta regolatoria esclude che gli studi eventualmente svolti per la classificazione dei rifiuti possano essere condotti in conformità alla BPL, a meno che non ci sia una specifica richiesta da parte di una Autorità Competente, che ne ha facoltà.

L'unico riferimento alla BPL si trova nell'ADR (Accordo sul trasporto di merci pericolose) relativamente alla classificazione H14 (ecotossico). Dal 25 marzo 2012, l'attribuzione della classificazione di pericolo H14 deve essere attribuita ai rifiuti applicando quanto previsto dai criteri di classificazioni presenti nell'accordo ADR (per le materie pericolose per l'ambiente acquatico liquide e solide) e conseguentemente i rifiuti pericolosi che presentano la caratteristica di pericolo H14, dovranno obbligatoriamente seguire le procedure imposte dall'ADR.

Nel testo dell'ADR al punto 2.2.9.1.10.2.2 si legge:

“Se la preferenza va ai dati ottenuti da metodi di prova armonizzati su scala internazionale, in pratica, i dati ottenuti da metodi nazionali possono anche essere utilizzati quando sono giudicati equivalenti. In genere è stato concordato che i dati che si riferiscono alla tossicità per le specie di acqua dolce e le specie marine sono generalmente considerati equivalenti e devono di preferenza essere ottenuti secondo le linee guida per le prove dell'OCSE o metodi equivalenti, conformi a una buona pratica di laboratorio (BPL). In mancanza di questi dati, la classificazione si deve basare sui migliori dati disponibili”.

È importante sottolineare che il testo ufficiale è esclusivamente quello in inglese, francese e russo pubblicato dall'ONU sul sito dell'UNECE, quindi la traduzione in lingua italiana non è ufficiale. Nella versione in inglese non si parla di 'conformità' (*compliance*) ai principi della BPL ma di test svolti in accordo ai principi di BPL (*according to the GLP principles*). Dal punto di vista formale, questa dizione fa una grande differenza, perché mentre studi svolti in conformità possono essere condotti solo in CdS certificati (nel rispetto completo dei principi), gli studi svolti 'secondo i principi' possono essere svolti in qualsiasi laboratorio, inclusi i CdS certificati per la BPL, che lavori ispirandosi ai principi di BPL in termini di qualità. Questo comporta la possibilità di svolgere gli studi in tempi più brevi (eliminando una serie di formalità che dovrebbero essere necessariamente ottemperate nel caso di studi 'conformi' alla BPL), più consoni allo scopo di classificazione del rifiuto per identificare le corrette procedure di smaltimento.

Un altro punto che vale la pena di evidenziare è che in ambito REACH, i test richiesti per identificare le caratteristiche chimico-fisiche di una sostanza, assimilabili a quelli necessari per identificare le classi H1-H3, non obbligatoriamente devono essere svolti in conformità alla BPL; è infatti indicato che possono essere utilizzati anche altri sistemi di qualità considerati 'equivalenti', salvo poi successivamente specificare che: “No other international standards have yet been recognized as being equivalent to GLP”.

Per le caratteristiche H4-H8 sono disponibili linee guida OECD per test *in vitro*, che verranno presentate nel dettaglio in un capitolo successivo, e che permettono di evitare l'uso di animali, nel rispetto delle politiche europee di riduzione del numero di animali nella sperimentazione e ove possibile di totale sostituzione.

Bibliografia di riferimento

- Costamagna FM, Marcello I, Di Prospero P (Ed.). Convegno. Applicazione del Regolamento CE 1272/2008: classificazione, etichettatura e imballaggio delle sostanze e delle miscele e ricadute nella legislazione correlata. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 13 maggio 2010. Atti. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2010.
- Europa. Direttiva 91/689/CEE del 12 dicembre 1991, relativa ai rifiuti pericolosi *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* L 377, 31 dicembre 1991.
- Europa. Decisione 2000/532/CE del 3 maggio 2000, modificata dalla decisione 2001/573/CE del Consiglio. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* L 203, 28.7.2001.
- Europa. Direttiva 2008/98/CE del 19 novembre 2008 relativa ai rifiuti. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 313, 22 novembre 2008.
- Europa. Regolamento CE 1272/2008 del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica ed abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 353, 31 dicembre 2008.
- Italia. Decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152. Norme in materia ambientale. *Gazzetta Ufficiale* n. 88 (Suppl. Ord.), 14 aprile 2006.
- Italia. Decreto legislativo 2 marzo 2007, n. 50, recante l'attuazione delle direttive 2004/9/CE e 2004/10/CE concernenti l'ispezione e la verifica della Buona Pratica di laboratorio (BPL) e il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative relative alla applicazione dei principi di BPL e al controllo della loro applicazione per le prove sulle sostanze chimiche. *Gazzetta ufficiale* n. 86, 13 aprile 2007.
- United Nations. *ADR (applicable as from 1 January 2011). European Agreement concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Road*. New York, Geneva: United Nations; 2010.

METODI *IN VITRO* RICHIESTI PER LA CLASSIFICAZIONE H4 E H8 DEI RIFIUTI

Laura Turco

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Tutta la normativa più recente in merito alla tutela della salute umana fa riferimento ai metodi alternativi alla sperimentazione animale come metodi “da preferire” rispetto a quelli classici che prevedono l’utilizzo di animali da laboratorio ogniqualvolta sia necessario eseguire test tossicologici. Oltre al Regolamento (CE) 1223/2009 per i cosmetici, che prevede il divieto degli esperimenti sugli animali nelle prove tossicologiche per la valutazione di sicurezza di ingredienti e prodotti finiti a partire da luglio 2013, il Regolamento (CE) 1107/2009 così come il n.528/2012 relativi all’immissione sul mercato e all’utilizzo rispettivamente di prodotti fitosanitari e di biocidi, e il Regolamento (CE) 1907/2006 (noto come REACH dall’inglese *Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals*) costituiscono esempi rilevanti della richiesta di utilizzare ove possibile metodologie alternative anche in ambito regolatorio. Il fatto che si usi il termine “preferire” non implica discrezionalità nella scelta del metodo ma, al contrario, sono definiti metodi alternativi per specifici campi di applicazione per i quali ognuno di essi è stato caratterizzato per la valenza predittiva dell’*end-point* tossicologico che essi sono chiamati a coprire. Ciascun metodo alternativo può essere utilizzato come test tal quale (*stand-alone test*) o all’interno di una strategia integrata di più test. La pertinenza del test da eseguire e la accettazione regolatoria è data dalla disponibilità o meno della relativa linea guida pubblicata dall’*Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD o in lingua italiana OCSE, Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico). Le Linee Guida OECD (*Test Guideline*, TG) sono reperibili e scaricabili gratuitamente in formato pdf dal sito web dell’OECD (<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforhetestingofchemicals.htm>). Nel caso dei cosmetici, a causa del divieto totale della sperimentazione animale, qualora la linea guida OECD non fosse ancora disponibile, è accettabile utilizzare protocolli approvati dallo *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (EURL-ECVAM). Tutte le informazioni relative ai test *in vitro* in corso di validazione sono consultabili al sito web: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>. OECD ed ECVAM costituiscono i soli organismi ufficiali che garantiscono al contempo sia la validità scientifica dei metodi alternativi che la loro robustezza in termini di capacità predittiva dei possibili effetti avversi sull’uomo. Questi metodi vengono indicati come VRM (*Validated Reference Method*).

Spesso viene fatta confusione tra metodi alternativi (ovviamente da intendersi sempre come alternativi alla sperimentazione animale ma per semplicità spesso il termine comparativo viene omesso) e metodi *in vitro* e si ignora che questi ultimi sono compresi nei primi che rappresentano una più ampia categoria. Per metodi alternativi, infatti, si intendono non solo tutti quei metodi che sostituiscono *in toto* l’utilizzo degli animali (metodi di *Replacement* tra cui sia i metodi *in vitro* che metodi non sperimentali ed eventuali metodi *in silico*) ma anche quelli i cui protocolli sono stati affinati e ottimizzati in modo tale da prevedere un numero inferiore di animali rispetto al protocollo classico (metodi di *Reduction*) o che minimizzano la sofferenza degli animali impiegati (metodi di *Refinement*).

La classificazione di un prodotto (inclusi i rifiuti) può essere condotta anche utilizzando metodologie non sperimentali, che fanno parte quindi del concetto più ampio di ‘metodo alternativo’ tra cui i) l’applicazione di Principi Ponte (*bridging principles*) basati sulla “somiglianza” nella composizione del prodotto o della miscela (a cui è assimilabile un rifiuto) da classificare con una miscela a composizione nota già classificata in base a risultati di saggi sperimentali (applicazione del principio del *read-across*); ii) il metodo di calcolo, basato sulla composizione quali-quantitativa delle miscele, applicando le formule di calcolo per gli effetti cosiddetti “additivi” (es. irritazione, tossicità) e i limiti di concentrazione generici o specifici negli altri casi.

La mancata disponibilità, almeno per ora, di metodi *in vitro* per i vari *end-point* tossicologici è dovuta alla difficoltà nel riprodurre *in vitro*, con sistemi sperimentali estremamente semplificati rispetto alla complessità dell’organismo, funzioni e strutture in origine più complesse, che risentono delle influenze delle interconnesse comunicazioni fisiologiche del sistema cellula-tessuto-organo-organismo. I metodi *in vitro* propriamente detti ad oggi disponibili quindi sono quelli in grado di riprodurre i processi tossicologici di tipo topico proprio perché si tratta di processi che si instaurano localmente al sito di esposizione/applicazione del tossico e che sono svincolati dai processi di assorbimento, distribuzione e metabolismo da parte dell’organismo.

L’allegato III della Direttiva 2008/98/CE (nota come Direttiva sui rifiuti) attribuisce i codici di pericolo H4 e H8 rispettivamente ai rifiuti irritanti e corrosivi; per la classificazione dei rifiuti relativa a queste due caratteristiche l’Allegato si riferisce al sistema di calcolo, ma introduce la possibilità di saggiare sperimentalmente la miscela e di classificarla in base ai risultati ottenuti. È facile capire che, se si sollevano problemi etici nel saggiare su animali da laboratorio prodotti da immettere sul mercato ai fini di valutarne la sicurezza d’uso per i consumatori, gli stessi problemi siano a maggior ragione validi in ambito di classificazione dei rifiuti per il loro smaltimento.

Irritazione e corrosione sono gli effetti topici da contatto per i quali si sono sviluppati, più facilmente che per altri processi di tossicità, modelli *in vitro* con ottime capacità predittive; per tali *end-point* di tossicità sono state adottate e pubblicate le relative linee guida da parte dell’OECD con metodi di totale sostituzione dell’animale.

Quando da un generico processo si generano due categorie di rifiuti che sottendono a due codici CER speculari uno pericoloso e uno non pericoloso, il detentore del rifiuto potrà adottare il codice non pericoloso solo verificando concretamente la non pericolosità. Tale verifica si effettua analiticamente individuando le sostanze che determinano le caratteristiche di pericolo; una volta individuate le sostanze, si procede alla loro determinazione quantitativa per la verifica del rispetto o meno della loro concentrazione dei valori soglia imposti dall’articolo 2 della Decisione 2000/532/CE.

Per quanto riguarda le classi di pericolo H4 e H8, qualora un rifiuto complesso da analizzare, presenti valori molto bassi o molto alti di pH (nello specifico quando l’eluato prodotto per lisciviazione presenti valori di $\text{pH} \leq 2$ o $\geq 11,5$) si potrà concludere che il rifiuto è corrosivo per la classe H8 qualora anche la valutazione della riserva acido/alcalina porti alla stessa conclusione; se, al contrario, la riserva acido/alcalina non conferma la caratteristica di corrosività questa dovrà essere confermata con uno dei test *in vitro* validati e per i quali quindi esiste la relativa linea guida OECD. L’esclusione della caratteristica H8 non esclude la pericolosità: è infatti necessaria la verifica ulteriore della caratteristica di irritante (H4), poiché le caratteristiche di corrosivo e irritante possono caratterizzare (o meno) la stessa sostanza in dipendenza della sua concentrazione. In altre parole, sostanze corrosive possono risultare irritanti a basse concentrazioni; al contrario sostanze irritanti non necessariamente risultano corrosive ad alte concentrazioni. Il parere dell’Istituto Superiore di Sanità del 16/05/2008 richiesto in merito alla classificazione dei rifiuti pericolosi caratterizzati da pH estremo indica lo schema decisionale da adottare per la classificazione H4/H8 (Figura 1).

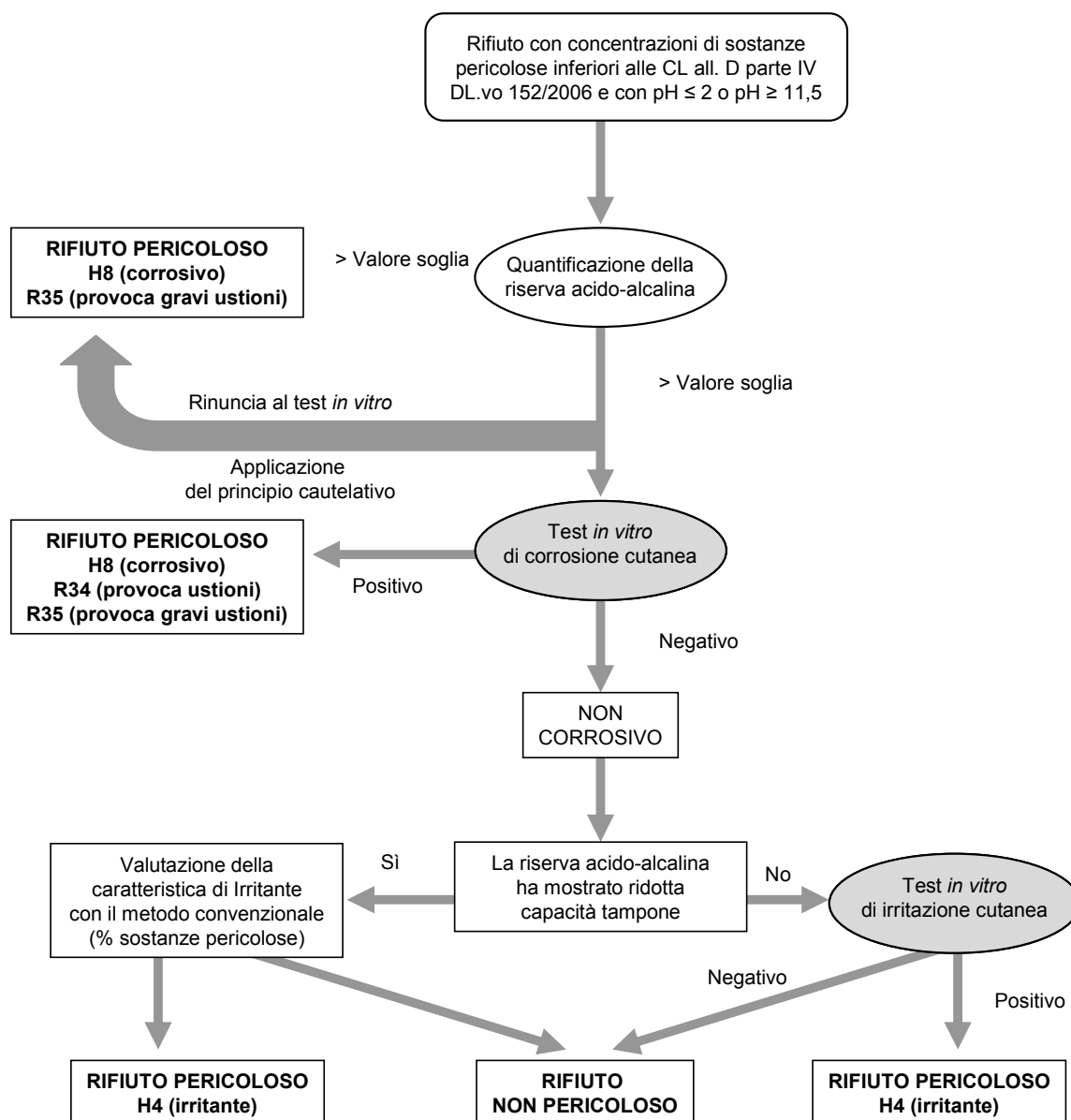


Figura 1. Schema decisionale per la classificazione H4 e H8 per i rifiuti caratterizzati da pH estremo (secondo il parere dell’ISS del 16/05/2008)

Questo processo decisionale per la classificazione H4 e H8 pone le metodologie *in vitro* per corrosione e irritazione come due sequenziali *step* decisionali che conducono alla classificazione di pericolosità del rifiuto e le relative frasi R in funzione della sensibilità del metodo stesso. L’allegato del Regolamento (CE) 440/2008 – successivamente modificato dal Regolamento (CE) 761/2009 – indica quali saggi *in vitro* è possibile utilizzare a questo scopo: B.40 (Saggio di resistenza elettrica transcutanea, corrispondente alla linea guida OECD: TG 430) e B.40bis (Saggio su modello di epidermide umana ricostituita, corrispondente alla linea guida OECD: TG 431) per la corrosione cutanea e B.46 (Saggio su modello di epidermide umana, corrispondente alla linea guida OECD: TG 439) per l’irritazione cutanea e specifica che

possono essere utilizzati solo saggi *in vitro* validati a livello internazionale da ECVAM e per i quali sia stato stabilito che la classificazione rientra tra gli scopi inerenti al campo di applicabilità di tali metodi.

Caratteristiche dei metodi *in vitro* utilizzati per la classificazione H4 e H8 dei rifiuti

OECD TG 430: saggio di resistenza elettrica transcutanea

Il saggio di resistenza elettrica transcutanea (*Transcutaneous Electrical Resistance*, TER) (OECD TG 430) è un metodo per la valutazione del potere corrosivo di sostanze e preparati non è un metodo di sostituzione del modello animale ma appartiene alle categorie *Reduction* e *Refinement* dei metodi alternativi in quanto l'impiego dell'animale non è totalmente escluso. Si tratta di un metodo *ex-vivo* poiché si utilizzano dischi di pelle di ratto come modello sperimentale. Tuttavia, essendo possibile ottenere più dischi dallo stesso ratto, il numero di animali sacrificati è notevolmente ridotto rispetto al metodo classico (*Reduction*); inoltre l'animale non subisce le possibili sofferenze causate dal trattamento poiché viene sacrificato nelle fasi preliminari all'esperimento (*Refinement*).

Per corrosione cutanea si intende un danno irreversibile della pelle che si manifesta con la necrosi dei tessuti che, dagli strati più esterni dell'epidermide, penetra fin nel derma. Il metodo TER (*Transcutaneous Electric Resistance*) si basa sul principio che il danno da corrosione si traduce nella perdita delle funzioni di barriera dello strato corneo, con conseguente caduta della resistenza elettrica che il disco di pelle, opportunamente alloggiato in un particolare apparato (Figura 2), oppone al passaggio di ioni tra due compartimenti che il disco stesso delimita come unico setto di separazione.

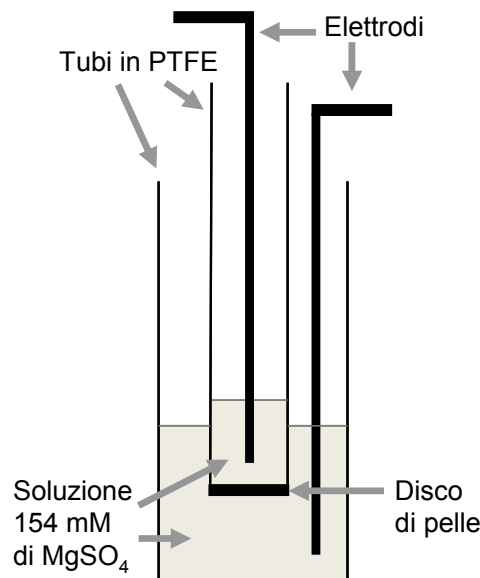


Figura 2. Apparato per l'esecuzione del saggio TER

Oltre la misurazione della resistenza elettrica tra i due comparti, il metodo prevede una successiva fase di colorazione del tessuto con sulforodamina B, come conferma dei risultati positivi, allo scopo di rendere biunivoco il legame tra la caduta della resistenza e la distruzione meccanica dello strato corneo della pelle ed escludere così la possibilità di falsi positivi. Il colorante usato, infatti, può penetrare nelle cellule degli strati cellulari sottostanti solo quando l'integrità dello strato corneo è compromessa. I falsi positivi sono possibili poiché alcune sostanze inducono un aumento della permeabilità agli ioni dello strato corneo senza comprometterne l'integrità (questo effetto si verifica ad esempio con alcuni detergenti e altri surfactanti). In presenza di un risultato positivo in termini di resistenza elettrica, la successiva fase di colorazione può essere evitata, qualora il danno tissutale sia macroscopicamente evidente.

Sulla specifica linea guida OECD sono riportate le sostanze di riferimento da utilizzare per assicurare la corretta performance del metodo (controlli positivo e negativo) e due liste di composti chiamati *Reference Chemicals* per la calibrazione del metodo, qualora vi siano deviazioni dal protocollo della Linea Guida (ad esempio un apparato con caratteristiche diverse) e *Proficiency Chemicals* per le prime prove che ogni laboratorio deve effettuare prima di utilizzare il metodo, allo scopo di dimostrare l'idoneità tecnica e strumentale necessaria. Sono anche stabiliti i 'criteri di accettabilità' sia del sistema test (valori di *cut-off* per il controllo della qualità del disco di pelle) che del metodo (valori relativi ai controlli positivo e negativo) nonché i riferimenti necessari per l'interpretazione dei risultati (valore di *cut-off* per la categorizzazione del composto).

Il test è applicabile ad un ampio spettro di classi di sostanze chimiche e di stati fisici quali liquidi, semi-solidi, solidi e cere. I liquidi possono essere sia acquosi che non acquosi e i solidi possono essere solubili o insolubili in acqua; inoltre è espressamente specificato nella Linea Guida che il metodo è applicabile anche a miscele di sostanze, caratteristica questa che lo rende idoneo per la classificazione dei rifiuti. Le uniche categorie escluse dal campo di applicabilità sono le sostanze sotto forma di gas e aerosol.

Il metodo TER discrimina tra corrosivi e non corrosivi cutanei con una sensibilità del 94% (51 positivi/54 noti corrosivi) e una specificità del 71% (48 negativi/68 noti non-corrosivi). Una limitazione del metodo consiste nella impossibilità di sub-categorizzare le sostanze in corrosivi severi e moderati.

OECD TG 431: saggio di corrosione cutanea su epidermide umana ricostituita

Al contrario del precedente, questo saggio di corrosione cutanea su epidermide umana ricostituita (*Reconstructed Human Epidermis*, RHE) sostituisce completamente il modello sperimentale animale. In questo caso, infatti, il sistema biologico consiste in porzioni di pelle umana ricostituita *in vitro* a partire da cheratinociti non trasformati di origine umana.

Specifiche tecniche di coltura e l'impiego di particolari supporti per la crescita delle cellule consentono un differenziamento cellulare diversificato in più strati epiteliali ben organizzati (strati basali, spinoso e granulare) e strato corneo stratificato con lipidi lamellari intercellulari analoghi a quelli presenti *in vivo*, che nel loro insieme mimano *in vitro* le caratteristiche istologiche, morfologiche, biochimiche e fisiologiche della parte più esterna della pelle umana, l'epidermide. Le caratteristiche di questo modello sperimentale, comprovate da studi formali di validazione, lo rendono molto simile al modello umano, facendo coincidere l'*end-point* valutato con quello misurato; la corrosione cutanea, infatti, sottende alla penetrazione dell'agente corrosivo nello strato corneo per azione erosiva o per semplice diffusione e porta alla successiva azione citotossica sulle cellule degli strati inferiori. Questo è quanto avviene anche nel modello

sperimentale, e la vitalità delle cellule degli strati sottostanti, che costituiscono il target dell'azione del tossico, è il parametro che viene misurato.

Quattro modelli RHE validati sono disponibili in commercio, due dei quali (EpiSkin™-SM e EpiDerm™SCT-EPI-200) sono i modelli di riferimento che hanno superato l'intero processo di validazione (sono infatti chiamati VRM, *Validated Reference Methods*); gli altri due modelli, epiCS® e lo SkinEthic™RHE, sono invece stati sottoposti alla cosiddetta *PS-based validation*, cioè un percorso di validazione abbreviato reso possibile grazie all'impiego di una lista di sostanze di riferimento (*performance standard*) che consentono di confrontare direttamente le "performance" dei modelli già validati con quelle di nuovi modelli, molto simili ai primi ma non uguali, al fine di verificarne la rispondenza ai criteri di accettabilità del metodo.

Una serie di prove sono preliminari all'uso di questi modelli ogniqualvolta debba essere svolto uno studio di carattere regolatorio (quindi anche per ottenere risultati relativi alla classificazione di un rifiuto): rientrano nel Controllo di Qualità, che ha lo scopo di dimostrare che ogni batch di RHE utilizzato rientri in definiti criteri di accettabilità (generalmente indicati dal produttore/fornitore del modello). Questi controlli preliminari riguardano le condizioni generali e funzionali del sistema biologico, quali la robustezza dello strato corneo nella sua funzione di barriera, in termini cioè di resistenza alla eccessiva penetrazione di sostanze (mediante l'uso di marker specifici), la vitalità degli strati cellulari più interni, la morfologia (mediante un esame istologico) e la riproducibilità del metodo (valutata con l'uso dei cosiddetti *Proficiency chemicals* che appartengono a composti di riferimento sia corrosivi che non-corrosivi). Questi dati prodotti dall'utilizzatore di epidermide ricostituita vanno confrontati con i relativi valori forniti dal produttore, che accompagnano ogni batch di RHE.

Il metodo è applicabile a sostanze liquide, solide e semi-solide e a miscele di sostanze, hanno quindi un ampio spettro di applicabilità.

Il protocollo sperimentale, descritto in dettaglio nella linea guida OECD TG 431, prevede l'uniforme applicazione della sostanza da testare sulla superficie dell'epidermide con incubazioni a tempi diversi, specifici per ognuno dei quattro diversi modelli. La vitalità cellulare si misura con il test MTT, dove l'acronimo indica il composto bromuro di 3-(4,5-diMetilTiazol-2-il)-2,5-difenilTetrazolio; il test si basa sulla capacità delle cellule, di ridurre il colorante MTT (sostanza di colore giallo) attraverso l'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi a formazano il quale ha colorazione blu/violacea (e diversa lunghezza d'onda di assorbimento). Tale reazione è valutata e misurata mediante la lettura spettrofotometrica del campione, alla lunghezza d'onda di 570 nm. L'enzima è attivo soltanto nelle cellule vive che abbiano mantenuto struttura e funzionalità integre; il test pertanto fornisce la quantificazione relativa della vitalità cellulare dei trattati rispetto ai controlli positivo e negativo come percentuale dei valori di Densità Ottica (*Optical Density*, OD) del colorante MTT estratto dalle cellule.

Per ogni metodo (specifico modello RHE e relativo protocollo) i risultati si confrontano con i valori specifici di *cut-off* che consentono di identificare e discriminare i corrosivi dai non-corrosivi.

La robustezza della capacità predittiva di questi modelli/metodi RHE permette la loro applicazione in ambito regolatorio ai fini di una classificazione che, ad esclusione del modello epiCS®, supera la semplice discriminazione tra corrosivi e non-corrosivi e permette una sub-categorizzazione dei corrosivi in categorie 1A, 1B e 1C così come definite dal sistema internazionale GHS (*Globally Harmonized System*) che ne indica la potenza relativa della capacità corrosiva. Poiché i diversi metodi non hanno la stessa accuratezza nella loro capacità predittiva di sub-categorizzazione, sarà l'autorità regolatoria dei diversi Paesi che deciderà la pertinenza dei test nella classificazione per ogni specifico ambito.

OECD TG 439: saggio di irritazione cutanea su epidermide umana ricostituita

In vivo il danno causato dall'irritazione si manifesta macroscopicamente sulla superficie della pelle con eritema ed edema, che rappresentano il risultato di una cascata di eventi. L'evento scatenante iniziale consiste nella penetrazione della sostanza attraverso lo strato corneo e nella successiva azione tossica sulle cellule sottostanti le quali possono rilasciare mediatori di infiammazione che agiscono sulle cellule del derma, in particolare, a livello dello stroma, sulle cellule endoteliali dei vasi sanguigni. Eritema ed edema sono infatti provocati dalla dilatazione e dalla aumentata permeabilità delle cellule endoteliali. Secondo il Sistema internazionale GHS l'irritazione cutanea è definita come danno reversibile della pelle provocato dal contatto con una sostanza per un tempo stabilito fino a quattro ore.

La tipologia dei modelli sperimentali sui quali si basa il saggio *in vitro* è la stessa (RHE) utilizzata per gli studi di corrosione cutanea descritti nella OECD TG 431, alla quale si applica un protocollo sperimentale diverso e specifico per l'irritazione (TG 439). Poiché i modelli RHE sono privi di vascolarizzazione, il metodo si basa sulla misura degli eventi iniziali del processo a cascata, cioè sul danno tissutale/cellulare: quindi l'*end-point* misurato è la vitalità cellulare (anche in questo caso mediante il test MTT).

Anche per l'irritazione cutanea sono quattro i modelli RHE validati e disponibili in commercio: EpiSkin™ (SM), EpiDerm™SIT (EPI-200), SkinEthic™RHE e LabCyte EPI-MODEL24 SIT.

I primi tre sono i metodi di riferimento VRM mentre l'ultimo è stato validato attraverso la lista dei *Proficiency Chemicals*. Anche con questo specifico protocollo per l'irritazione i modelli RHE possono essere utilizzati per testare sia sostanze singole che miscele e sia allo stato liquido che solido.

Il protocollo sperimentale prevede l'applicazione della sostanza da testare in modo uniforme sulla superficie dell'epidermide con tempi di incubazione che variano dai 15 ai 60 minuti e con temperatura tra 20 e 37°C. Tempi di esposizione e temperatura dipendono strettamente dal tipo di modello RHE e riflettono le specifiche caratteristiche intrinseche di ognuno di essi, soprattutto per quanto riguarda le proprietà di barriera che determinano la maggiore o minore resistenza alla penetrazione della sostanza. Successivamente al periodo di incubazione con la sostanza il test MTT fornisce la quantificazione delle cellule che hanno mantenuto le funzioni vitali. Secondo il sistema GHS il valore *cut-off* per discriminare gli irritanti dai non irritanti è 50%: una vitalità $\leq 50\%$ rileva una azione irritante da parte della sostanza test. Questo saggio *in vitro* è valido per la classificazione di sostanze irritanti per la Categoria 2 (forti irritanti) del sistema GHS. Nei Paesi che non adottano la sub-categorizzazione 3 (irritanti leggeri) può essere adottato per la classificazione dei cosiddetti *non-classified chemicals*.

Altri *end-point* di tossicità locale valutabili con metodi *in vitro* utilizzabili per la classificazione di miscele

Sotto l'aspetto della tossicità locale i modelli sviluppati consentono di riprodurre gli *end-point* di interesse con elevata robustezza in termini di rilevanza e, come descritto nei paragrafi precedenti, hanno un'ottima capacità predittiva per le valutazioni di corrosione e irritazione cutanea.

Per quanto riguarda corrosione e irritazione oculare non si dispone di modelli umani ricostituiti altrettanto validi, a causa della complessità della struttura dell'occhio. I modelli disponibili infatti prevedono l'utilizzo di occhi isolati di bovino (BCOP, *Bovine Corneal Opacity and Permeability Test*, linea guida OECD: TG 437) o di pollo (ICE, *Isolated Chicken Eye Test*, linea guida OECD: TG 438) e vengono considerati test di sostituzione poiché gli

espianti derivano da animali precedentemente destinati all'uso alimentare il cui sacrificio quindi non è legato a fini scientifici; questi metodi non possiedono una elevata sensibilità e sono applicabili soprattutto con una valenza di identificazione di corrosivi e severi irritanti, discriminandoli dai non irritanti: non sono infatti in grado di intercettare le sostanze con potenziali di irritazione debole o moderata. Inoltre per il metodo ICE si ha la limitazione aggiuntiva della impossibilità di applicazione con sostanze allo stato solido.

In fase di pre-validazione esistono modelli di cornea umana ricostituita ma si tratta di metodi altamente specifici e che non ricoprono tutti i possibili effetti di corrosione/irritazione a carico di strutture oculari diverse dalla cornea quali ad esempio congiuntiva e iride. Sono state proposte strategie integrate di test con lo stesso *end-point* basate sulla possibilità di ottenere una informazione completa dalle singole capacità predittive in termini di specificità e sensibilità dei diversi metodi.

Stesse limitazioni si incontrano anche per la sensibilizzazione cutanea, altro processo tossicologico di interesse per l'esposizione topica ma la cui evoluzione implica processi di tipo sistemico, almeno nelle fasi più avanzate. I metodi *in vitro* sviluppati finora, ancora in corso di (pre)validazione, sono metodi che, pur sfruttando reazioni precoci del processo a cascata, si limitano solo ad alcuni dei possibili *pathway* cui il processo di sensibilizzazione sottende. Si tratta cioè di metodi altamente specifici, la cui stretta specificità va a discapito della sensibilità del metodo stesso, poiché non sono in grado di rilevare sostanze sensibilizzanti che agiscono attraverso reazioni iniziali diverse da quelle sulle quali il singolo metodo si basa. Solo la completa conoscenza di tutti i possibili meccanismi che confluiscono poi nella sensibilizzazione come effetto finale potrà portare ad una batteria di test *in vitro* che sia in grado di escludere totalmente l'impiego del modello animale.

Al momento, nonostante lo sviluppo di strategie integrate di test *in vitro* abbia portato ad ampliare il campo di applicabilità di questi ultimi per una sorta di additività di informazione dovuta alla loro complementarietà d'uso, per gli altri *end-point* tossicologici di tipo sistemico è necessario ancora ricorrere al modello animale; è però possibile operare con una riduzione notevole del numero di animali proprio in virtù delle informazioni che i metodi *in vitro* consentono di ottenere in fasi preliminari. In ogni caso alla sostituzione completa si potrà arrivare solo con la conoscenza di tutto lo scenario di reazioni che sono alla base del meccanismo d'azione a livello cellulare e molecolare delle diverse reazioni tossiche e degli algoritmi che permetteranno di tradurre una concentrazione *in vitro* in una dose di esposizione *in vivo* (Adler *et al.*, 2011). Come obiettivo intermedio si pone l'applicazione delle strategie di *Reduction* e *Refinement* che sono possibili e attuabili da subito. Il percorso decisionale proposto dall'Istituto Superiore di Sanità per la classificazione H4 e H8, relativa alla nuova normativa sui rifiuti, è una testimonianza delle possibilità di applicazione pratica di questi modelli sperimentali in specifiche aree tossicologiche di competenza delle quali la tossicità locale costituisce un buon esempio.

Bibliografia

- Adler S, Basketter D, Creton S, Pelkonen O, van Benthem J, Zuang V, Andersen KE, Angers-Loustau A, Aptula A, Bal-Price A, Benfenati E, Bernauer U, Bessems J, Bois FY, Boobis A, Brandon E, Bremer S, Broschard T, Casati S, Coecke S, Corvi R, Cronin M, Daston G, Dekant W, Felter S, Grignard E, Gundert-Remy U, Heinonen T, Kimber I, Kleinjans J, Komulainen H, Kreiling R, Kreysa J, Leite SB, Loizou G, Maxwell G, Mazzatorta P, Munn S, Pfueller S, Phrakonkham P, Piersma A, Poth A, Prieto P, Repetto G, Rogiers V, Schoeters G, Schwarz M, Serafimova R, Tahti H, Testai E, van Delft J, van Loveren H, Vinken M, Worth A, Zaldivar JM. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Arch Toxicol* 2011;85(5):367-485.

- Europa. Decisione 2000/532/CE del 3 maggio 2000, modificata dalla decisione 2001/573/CE del Consiglio. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* L 203, 28.7.2001.
- Europa. Direttiva 2008/98/CE del 19 novembre 2008 relativa ai rifiuti. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 313, 22 novembre 2008.
- Europa. Regolamento (CE) N. 440/2008 della Commissione del 30 maggio 2008 che istituisce i metodi di prova ai sensi del Regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 142/1 del 31 maggio 2008.
- Europa. Regolamento (CE) N. 761/2009 della Commissione del 23 luglio 2009 recante modifica, ai fini dell'adeguamento al progresso tecnico, del Regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 220/1 del 24 agosto 2009.
- Parere dell'Istituto Superiore di Sanità espresso in data 16/05/2008 avente per oggetto "DLvo 152/2006, parte IV – Richiesta parere sulla classificazione dei rifiuti pericolosi corrosivi e irritanti" (Protocollo n. 2423 AMPP/IA)

TEST RICHIESTI PER LA CLASSIFICAZIONE ECOTOSSICOLOGICA

Silvia Marchini

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Aspetti normativi

La Direttiva 2008/98/CE sui rifiuti (1) definisce come H14 – Ecotossico un “rifiuto che presenta o può presentare rischi immediati o differiti per uno o più comparti ambientali”. La legge 28/2012 (2) stabilisce che, nelle more di una normativa specifica, la classificazione dei rifiuti per la caratteristica H14 sia condotta secondo quanto previsto dall’Accordo europeo relativo ai trasporti internazionali di merci pericolose su strada (ADR) (3). Tale accordo indica come appartenenti alla classe 9 (sostanze e articoli pericolosi diversi) le sostanze pericolose per l’ambiente, definite come sostanze liquide o solide inquinanti per l’ambiente acquatico e soluzioni e miscele di tali sostanze come preparati e rifiuti, come indicato nelle sottoclassi M6 ed M7.¹

Come illustrato in maggior dettaglio nei contributi precedenti, la classificazione di pericolo acuto e cronico delle sostanze e miscele per l’ambiente acquatico secondo l’ADR si basa in primo luogo sui dati di tossicità disponibili (nella versione aggiornata del 2013 non ci sono variazioni a riguardo). Per la classificazione di rischio cronico delle sostanze, questi ultimi sono supportati, laddove pertinenti, da informazioni sul bioaccumulo potenziale o misurato e sulla degradazione biotica e abiotica. A tale proposito va ricordato che per le sostanze inorganiche e metalli i criteri e misure di degradabilità e bioaccumulo indicati nell’ADR non sono applicabili, per le miscele in quanto tali (quali sono in genere i rifiuti) questi dati non possono essere determinati sperimentalmente, e per i rifiuti è probabile che tali informazioni non possano essere raccolte per tutti i componenti.

L’approccio sperimentale per l’identificazione di un rifiuto “ecotossico” nelle “voci specchio” è richiesto quando la sua composizione non è (sufficientemente) nota o non è possibile classificarlo sulla base delle informazioni disponibili per i singoli componenti, come può accadere nel caso di miscele complesse. A differenza di quanto stabilito per le sostanze, per la classificazione di pericolo cronico delle miscele non è prevista, in assenza di dati sperimentali, la possibilità di utilizzare dati di tossicità acuta sulle stesse (punto 2.2.9.1.10.4.3 dell’ADR), con evidenti e importanti implicazioni per la strategia sperimentale mirata alla classificazione dei rifiuti. Infatti, mentre la verifica della categoria di pericolo acuta (EC_{50} (*Effective Concentration*) o LC_{50} (*Lethal Concentration*) ≤ 1 mg/L per pesci o crostacei o alghe/piante) è sufficiente da sola per l’attribuzione della caratteristica H14, qualora la categoria acuta non sia assegnabile (> 1 mg/L o $>$ solubilità in acqua per tutti e tre gli organismi) il pericolo cronico (≤ 1 mg/L per pesci o crostacei o alghe/piante) non può essere escluso. Ne consegue che, per poter concludere su base sperimentale che un rifiuto saggiato *in toto* è “non ecotossico”, è necessario verificare che il criterio, più conservativo, per la categoria cronico (NOEC (*No Observed Effect Concentration*) o EC_x ($x\%$ *Effective Concentration*) > 1 mg/L o $>$ solubilità in acqua) sia superato per tutti e tre gli organismi.

¹ Nella traduzione italiana dell’ADR (versione non ufficiale del 2011 attualmente in rete) sono stati rilevati imprecisioni ed errori. Nel presente capitolo si fa perciò riferimento alla versione originale in inglese, mantenendo una terminologia coerente con altre normative correlate, quali per esempio CLP (4).

Con l'adozione della norma ADR viene pertanto a decadere, relativamente all'approccio sperimentale per la classificazione H14, quanto indicato nel precedente parere espresso congiuntamente da Istituto Superiore di Sanità (ISS) e Istituto Superiore per la Protezione Ambientale (ISPRA) (5), che prevedeva l'esecuzione di una batteria di test, comprendente il test con il batterio luminescente *Vibrio fischeri*, il test con alghe (*Pseudokirchneriella subcapitata*) e quello acuto con *Daphnia magna*, in cui gli organismi erano esposti a diluizioni seriali del campione e i risultati erano espressi in percentuale in funzione del rapporto di diluizione.

Test ecotossicologici

È generalmente riconosciuto che i test misurano l'effettiva tossicità di una miscela/rifiuto (inglobando le proprietà di persistenza e accumulo dei componenti), evitano falsi positivi (riflettendo gli effetti dovuti alla sola frazione biodisponibile), integrano le interazioni tra i suoi componenti e superano/limitano la necessità di misure analitiche. Gli studi ecotossicologici possono pertanto confutare la classificazione basata sulle analisi chimiche, come ad esempio mostrato per varie tipologie di ceneri la cui classificazione basata sul contenuto totale delle sostanze nelle matrici solide sovrastimava di gran lunga le risposte tossiche osservate con gli eluati (6).

Nei vari contesti regolatori e scientifici, c'è accordo nel riconoscere che poiché la tossicità di una sostanza (e tanto più di una miscela) è specie-specifica e non è possibile individuare il test od organismo "più sensibile", è necessario che la valutazione del pericolo ambientale si fondi su una batteria di test con organismi rappresentativi dei diversi livelli trofici (decompositori, produttori, consumatori primari e secondari) e delle diverse vie di esposizione. Va notato comunque che anche la specie "rappresentativa" non sempre si rivela quella più sensibile all'interno dello stesso gruppo tassonomico (7).

L'importanza di utilizzare test standardizzati, al fine di garantire la loro ripetibilità (variabilità intralaboratorio), riproducibilità (variabilità interlaboratorio) e precisione/accuratezza della risposta, è evidente specie in ambito regolatorio quale quello della classificazione. L'ADR dà preferenza a linee guida internazionali, quali quelle dell'*Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD o in lingua italiana OCSE, Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico) o equivalenti, ma prevede la possibilità di usare anche metodi nazionali, se equivalenti. Si fa presente che le linee guida OECD (*Test Guidelines*, TG) vengono periodicamente aggiornate per adeguarsi ai progressi scientifici e, per alcuni test, le versioni incluse nella parte C del Regolamento (CE) 440/2008 (8), alla quale fa riferimento il Regolamento CLP (4), sono superate. Le linee guida OECD sono disponibili all'indirizzo http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-2-effects-on-biotic-systems_20745761. Nel presente capitolo si fa riferimento principalmente a queste linee guida, ma per molti dei test citati sono disponibili altri metodi standardizzati (*International Organization for Standardization*, ISO; *American Standard Testing and Materials*, ASTM; *Environment Canada*).

Per la classificazione ambientale, l'ADR indica i pesci, i crostacei e le alghe/piante acquatiche come *taxa* rappresentativi degli organismi consumatori e produttori, e in generale della biocenosi acquatica, analogamente a quanto richiesto per la valutazione di rischio per l'ambiente acquatico delle sostanze e formulati (biocidi, pesticidi, ecc.). In tutti i casi, gli organismi decompositori non sono inclusi. È lasciata la possibilità di utilizzare dati su altri organismi se questi rappresentano specie ed *end-point* equivalenti, permettendo, di fatto, una certa flessibilità ma dando anche adito a diverse interpretazioni.

A ogni modo, la classificazione di pericolo secondo ADR comporta la messa a punto di opportune modifiche metodologiche per l'esecuzione dei test standard (tradizionali o "equivalenti") con i rifiuti, che tengano conto anche delle molteplici tipologie di rifiuto. Fasi critiche sono la procedura di preparazione del campione, dell'estratto acquoso/lisciviato (inclusa la scelta del medium) e del suo trattamento prima di sottoporlo ai test di ecotossicità. Da questi ultimi dipendono, infatti, la solubilità dei componenti del rifiuto (nel medium di prova e alle condizioni del test) e la loro biodisponibilità, in ultima analisi la tossicità del rifiuto e la sua classificazione.

I test tossicologici sono in genere condotti con una serie di concentrazioni (almeno 5) del materiale in esame ma, qualora interessi il superamento o meno di una soglia (come per la classificazione) possono essere condotti con una sola concentrazione corrispondente a quella soglia o al limite di solubilità in acqua del materiale in esame (test limite). La verifica analitica del mantenimento della concentrazione del materiale testato, richiesta dai test OECD, non è applicabile agli estratti di rifiuti, dove spesso i componenti sono numerosi e non noti. In questi casi è opportuno adottare misure tali da limitare il rischio di perdita di concentrazione, per esempio rinnovando le soluzioni e condizionando i contenitori di prova.

Nell'interpretazione dei risultati dei test occorre tener presente i possibili fattori confondenti di varia natura, che a causa della complessa composizione dei rifiuti possono essere molteplici e interferire con la misura della tossicità (es. presenza nel medium di agenti responsabili della chelazione dei metalli pesanti, diminuzione della concentrazione delle sostanze durante il test a causa di degradazione rapida o adsorbimento alle pareti dei contenitori, deriva del pH, livello di ossigeno disciolto, di ammoniaca e di sali, torbidità e colore dell'estratto o lisciviato, presenza di microrganismi, ecc.).

Test di tossicità acuta

I test di tossicità acuta misurano gli effetti severi (spesso letali) prodotti dalle sostanze chimiche a seguito ad una esposizione di breve durata (in genere 2-7 giorni). Va sottolineato che "breve durata" è da intendersi in relazione alla lunghezza del ciclo vitale dell'organismo, pertanto anche test di poche ore o giorni possono fornire informazioni di tossicità cronica su organismi a ciclo vitale breve. I risultati dei test acuti sono espressi come concentrazione alla quale gli effetti sono misurati sul 50% degli individui esposti (es. LC_{50} per mortalità nei pesci, EC_{50} per immobilizzazione nella *Daphnia*) o alla quale una risposta è ridotta al 50% rispetto al controllo (es. E_rC_{50} nel caso di inibizione della crescita nelle alghe). Statisticamente, la LC_{50} e EC_{50} rappresentano la mediana della distribuzione (normale) della sensibilità della specie. Statisticamente, la LC_{50} o EC_{50} rappresentano statisticamente la mediana della distribuzione (normale) della sensibilità della specie.

I test dell'OECD su pesci, crostacei, alghe e piante indicati nell'ADR sono descritti sinteticamente nelle Tabelle 1-4; si rimanda alle linee guida originali per il testo completo. Il test algale OECD TG 201 (Tabella 3), revisionato nel 2011 per modifiche sulla analisi statistica non lineare, è un test a breve termine ma multigenerazionale e pertanto fornisce *end-point* di tossicità cronica. Generalmente, la EC_{50} viene utilizzata per esprimere la tossicità acuta e la $NOEC/EC_{10}$ per quella cronica (8, 11). L'EC è derivata da analisi di regressione lineare (modificata per dati continui) o non lineare, che gestisce meglio le irregolarità alle percentuali di effetto basse. Nella derivazione dell'EC è raccomandato che il calcolo e utilizzo dell'*end-point* basato sul tasso di crescita (E_rC_{50} o NOE_rC) piuttosto che di quello basato sull'incremento di biomassa (E_bC_{50} o NOE_yC), in quanto, pur fornendo in genere un valore più alto (meno conservativo) del secondo è considerato scientificamente più affidabile in quanto indipendente dal disegno sperimentale (12).

Tabella 1. OECD TG 203/C1: pesci, test di tossicità acuta (8, 9)

Parametro	specifica
Specie	<i>Pimephales promelas</i> ; <i>Cyprinus carpio</i> ; <i>Oryzias latipes</i> ; <i>Poecilia reticulata</i> ; <i>Lepomis macrochirus</i> ; <i>Oncorhynchus mykiss</i> .
Organismi	lunghezza 2-5 cm \pm 1 (a seconda della specie)
Durata	96 ore
Procedura	statica/semistatica/flusso continuo
Numero organismi	≥ 7 /concentrazione
Repliche	non specificate
Volume soluzione	1 g pesce/L (in regime statico/semistatico)
Temperatura	a seconda della specie mantenuta entro $\pm 2^\circ\text{C}$
pH	6-8.5 (mantenuto entro 1.5 unità)
Durezza acqua	10-250 mg CaCO_3 /L
Fotoperiodo	12-16 ore luce
Alimentazione	nessuna
Misura	mortalità
<i>End-point</i>	96 h LC_{50}
Osservazioni	anormalità visibili
Criteri di validità	$\leq 10\%$ individui morti nel controllo; O_2 disciolto $\geq 60\%$ mg/L in tutte le concentrazioni

Tabella 2. OECD TG 202/C2: *Daphnia* sp., test acuto di immobilizzazione (8, 10)

Parametro	specifica
Specie	<i>Daphnia</i> sp.
Organismi	neonati < 24 ore
Durata	48 ore
Procedura	statica/semistatica
Numero organismi	20/concentrazione
Repliche	4
Volume soluzione	minimo 10 mL/replica
Temperatura	$20 \pm 2^\circ\text{C}$ (mantenuta entro $\pm 1^\circ\text{C}$)
pH	6-9 (mantenuto entro 1,5 unità)
Durezza acqua	140-250 mg CaCO_3 /L
Fotoperiodo:	16 ore luce (se necessario al buio)
Alimentazione	alghe
Misura	immobilizzazione
<i>End-point</i>	48 h EC_{50}
Osservazioni	colore, intrappolamento alla superficie dell'acqua
Criteri di validità	$\leq 10\%$ individui immobili, sbiaditi o intrappolati nel controllo; O_2 disciolto ≥ 3 mg/L in tutte le concentrazioni

Tabella 3. OECD TG 201: alghe e cianobatteri di acqua dolce, test di inibizione della crescita (13)

Parametro	specifica
Specie	alghe verdi: <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> , <i>Desmodesmus subspicatus</i> (anche diatomee e cianobatteri)
Organismi	colture in crescita esponenziale
Durata	72 ± 24 ore
Procedura	Statica
Numero organismi	5 x 10 ³ - 10 ⁴ cellule/mL (<i>P. subcapitata</i>), 2-5 x 10 ³ cellule/mL (<i>D. subspicatus</i>)
Repliche:	3 (per il controllo preferibile 6)
Medium	sintetico: US EPA (pH 7.5) o OECD* (pH 8.1)
Volume del mezzo	adeguato per scambio gassoso (ottenuto con agitazione/scuotimento)
Temperatura	21-24 ± 2 °C
pH	aumenti fino a ± 1,5 unità nel controllo (inferiore per metalli e composti ionizzabili)
Fotoperiodo	luce continua
Illuminazione	4500-9000 lux
Misura	numero di cellule (mediante conta, fluorescenza)
Risposta	riduzione del tasso specifico di crescita (r) rispetto al controllo; (aggiuntionale: riduzione dell'incremento in biomassa (y) rispetto al controllo)
End-point	E _r C ₅₀ (e E _y C ₅₀) per la tossicità acuta; NOE _r C/EC _x (e NOE _y C/E _y C _x) per la tossicità cronica
Osservazioni	anormalità delle cellule
Criteri di validità	Aumento della concentrazione cellulare nel controllo in 72 ore: 16 volte; Coefficiente di variazione dei tassi di crescita specifici medi nelle repliche del controllo: <7%; Coefficiente di variazione medio dei tassi di crescita calcolati per ogni giorno nelle repliche del controllo: <35%

* Rapporto molare EDTA/Fe tale da prevenire la precipitazione del ferro e minimizzare la chelazione dei metalli pesanti

Tabella 4. OECD TG 221/C20: *Lemna sp.*, test di inibizione della crescita (8, 15,)

Parametro	specifica
Specie	<i>Lemna minor</i> , <i>Lemna gibba</i>
Organismi	Piante con 2-4 fronde
Durata	7 giorni
Procedura	Statica, semi-statica, flusso continuo
Numero organismi	9-12 fronde
Repliche:	3 (per il controllo preferibile 6)
Medium	SIS per <i>L. minor</i> , 20X AAP per <i>L. gibba</i> , Steinberg medium per ambedue
Volume del mezzo	100 mL, profondità minima 2 cm
Temperatura	24 ± 2°C
pH	A seconda del mezzo di coltura. Aumenti fino a ± 1,5 unità nel controllo (inferiore per metalli e composti ionizzabili)
Fotoperiodo:	luce continua
Illuminazione	6500-10000 lux
Misura	numero di fronde e area totale delle fronde o peso
Risposta	riduzione del tasso specifico di crescita rispetto al controllo (r); aggiuntionale: riduzione dell'incremento in biomassa (y)
End-point	ErCx (e EyCx); NOEC (opzionale)
Osservazioni	Variazioni nello sviluppo delle piante
Criteri di validità	Incremento n° fronde di 7 volte (tasso di crescita specifico = 0,275/giorno)

Si fa osservare che l'estensione della durata del test a 96 ore non fornisce necessariamente una risposta più severa di quella misurata a 72 ore, anzi non è raro osservare un recupero della popolazione algale e quindi effetti meno marcati. L'ADR prevede che, qualora la metodologia sperimentale sia adatta, i dati su piante acquatiche (quali *Lemna* sp.) possano essere presi in considerazione in alternativa a quelli sulle alghe (vedi Tabella 4).

Lemna, sebbene sia una fanerogama, si propaga in maniera vegetativa, accrescendosi dal centro meristemico. Il ciclo riproduttivo è rapido, pertanto il test a 7 giorni fornisce risposte di tipo cronico ma, analogamente all'approccio seguito per le alghe, l'EC₅₀ è in genere utilizzato come *end-point* di tossicità acuta (14).

Poiché *Lemna* galleggia sulla superficie dell'acqua, il test rappresenta una alternativa a quello algale nei casi di estratti torbidi/colorati, dove la riduzione della luce interferirebbe con la fotosintesi.

Test di tossicità cronica

I test cronici consentono di determinare gli effetti avversi letali e in particolare quelli subletali (es. inibizione della crescita o riproduzione) delle sostanze chimiche e loro prodotti di degradazione, conseguenti un'esposizione prolungata, che copre gran parte del ciclo vitale di un organismo o anche più generazioni, a concentrazioni più basse di quelle che causano effetti letali nei test acuti.

La limitazione dell'esposizione ai soli stadi vitali più sensibili consente di ridurre notevolmente i tempi di esecuzione dei test cronici e i relativi costi, mantenendone al contempo la sensibilità e capacità discriminativa.

Un buon esempio è il test OECD TG 210 (16) sugli stadi di vita precoci dei pesci, che inizia con le uova appena fertilizzate e termina dopo che le larve si sono alimentate da fonte esogena per un certo periodo. Il test, pur essendo un test sub-cronico, è in grado di predire la tossicità cronica e pertanto è comunemente utilizzato nella valutazione del rischio e nella classificazione (incluso l'ADR).

La tossicità cronica è tradizionalmente espressa come la concentrazione più elevata alla quale non sono osservati effetti statisticamente diversi dal controllo (NOEC); a questo *end-point* si è andato nel tempo affiancando/sostituendo un *end-point* derivato da metodi statistici di regressione (EC_x) che rappresenta la concentrazione alla quale si osservano effetti su un percentile x degli organismi esposti o della risposta misurata (es. inibizione della crescita).

La scelta del percentile per i vari gruppi di organismi (tale da rendere EC_x equivalente al NOEC) è in discussione in vari forum e deve tener conto, tra l'altro, anche della differenza tra significato statistico e significato biologico di un effetto. In genere è utilizzato EC₁₀ (11, 17).

La maggiore appropriatezza di esprimere i risultati di un test come NOEC o EC_x è determinata dal disegno sperimentale (numero di repliche e di concentrazioni).

I test di tossicità cronica OECD su pesci e *Daphnia magna* menzionati nell'ADR sono brevemente illustrati nelle Tabelle 5 e 6, mentre quelli sulle alghe e piante sono gli stessi già descritti sopra (vedi Tabelle 3 e 4). Si rimanda alle linee guida originali per il testo completo.

Ai fini della classificazione dei rifiuti i test cronici sopra descritti appaiono di difficile applicazione principalmente a causa della lunga durata, dei volumi di estratto acquoso necessari e dei ripetuti rinnovi richiesti dalla procedura semistatica.

Per il test con pesci, ulteriori ostacoli sono rappresentati dalla complessità di esecuzione e dalla necessità di autorizzazioni per l'uso di animali vertebrati.

Tabella 5. OECD TG 210: pesci, test di tossicità sugli stadi di vita precoci (16)

Parametro	specifica
Specie	<i>Pimephales promelas</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Danio rerio</i> , <i>Oryzias latipes</i> / <i>Cyprinodon variegatus</i> , <i>Menidia sp.</i>
Organismi	uova prima dello stadio di gastrula
Durata	28-60 gg dopo la schiusa (30 gg per <i>D. rerio</i>)
Procedura	semistatica/flusso continuo
Numero organismi	80 uova/concentrazione
Repliche	4
Medium	adeguato per la sopravvivenza e crescita dei pesci
Contenitori	volume adeguato (7 l per pesci piccoli)
Volume soluzione	g pesce/L sufficiente per mantenere $\geq 60\%$ O ₂
Temperatura	appropriata per la specie ($26 \pm 1,5$ °C per <i>D. rerio</i>)
Fotoperiodo	appropriato per la specie (12-16 ore luce per <i>D. rerio</i>)
Alimentazione	secondo la specie (dal 2° giorno dopo la schiusa per <i>D. rerio</i>)
Misura	mortalità, schiusa, anormalità, comportamento, peso, lunghezza
End-point	30/60gg NOEC/ECx
Criteri di validità	Ossigeno disciolto $>60\%$ della saturazione; temperatura mantenuta entro $\pm 1,5$ °C; mantenimento delle concentrazioni nelle soluzioni durante il test; nel controllo, sopravvivenza delle uova e delle larve nei limiti stabiliti per la specie ($>70\%$ e $>75\%$ rispettivamente per <i>D. rerio</i>).

Tabella 6. OECD TG 211: *Daphnia magna*, test di riproduzione (18)*

Parametro	specifica
Specie	<i>Daphnia magna</i>
Organismi	piccoli < 24 ore
Durata	21 gg
Procedura	Semistatica
Numero organismi	20/concentrazione
Repliche	4
Medium	M4, M7 o altri adeguati adeguato per la sopravvivenza e riproduzione
pH	6-9
Volume soluzione	50 mL
Temperatura	20 ± 2 °C
Fotoperiodo	16 ore luce
Alimentazione	alghe unicellulari (0,1-0,2 mg C/ <i>Daphnia</i> /g)
Misura	mortalità delle madri, numero di piccoli (lunghezza)
End-point	21 gg EC _x /NOEC
Criteri di validità	Nel controllo: mortalità delle femmine iniziali $\leq 20\%$; numero medio di piccolo vivi/femmina sopravvissuta alla fine del test > 60 . In tutte le concentrazioni: mortalità accidentale delle femmine $\leq 20\%$.

* revisione 2012 (recante aggiornamenti su analisi dei dati, disegno sperimentale, trattamento dei risultati, introduzione di un test limite).

Altri test “equivalenti”²

La normativa comunitaria ha adottato il principio di sostituzione, riduzione e miglioramento della sperimentazione su animali vertebrati, incoraggiando l'uso di metodi alternativi, come esplicitato nel considerando 47 del Regolamento (CE) 1907/2006 (noto come REACH dall'inglese *Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals*) (17). A questo scopo sono stati messi a punto test acuti e cronici con embrione di pesce, che non rientra nella definizione di “animale” secondo la Direttiva 2010/63/UE (19), in quanto, benché si protraggano anche dopo la schiusa delle uova, terminano prima che la larva abbia raggiunto lo stadio in cui si nutre autonomamente.

Il test OECD TG 236 (20) misura la tossicità acuta sugli stadi embrionali del pesce *Danio rerio*, a partire dalle uova allo stadio di 16 cellule al massimo. Dopo una pre-esposizione, durante la quale si selezionano le uova fecondate, queste sono trasferite (entro 3 ore dalla fecondazione) nei pozzetti previamente condizionati con la soluzione in esame, che viene rinnovata a intervalli regolari. Gli effetti misurati come indicatori di mortalità sono: coagulazione, mancata formazione di somiti, mancato distacco della coda, mancanza di battito cardiaco, espressi come 96 ore LC₅₀. La durata del test consente l'esposizione anche degli stadi larvali iniziali. Un attributo importante di questo test *in vitro* è quello di utilizzare un sistema biologico complesso, anche se la capacità metabolica dell'organismo non è ancora completa e il corion potrebbe rappresentare una barriera alla biosponibilità delle sostanze chimiche.

Un test di tossicità “cronica” a breve termine sui pesci è OECD TG 212 (21), che inizia con le uova appena fertilizzate e termina alla fine dello stadio larvale di nutrizione endogena. Il test è condotto in regime semistatico o flusso continuo ed ha una durata di 8-10 giorni per *Danio rerio* (più lunga per altre specie). Sono misurati effetti letali (schiusa, sopravvivenza degli embrioni e larve) e subletali (lunghezza, aspetto e comportamento anormale delle larve), espressi come NOEC o LC/EC_x. Rispetto al test OECD TG 210 (16), questo test ha una durata sensibilmente inferiore, con conseguente riduzione di costi, ma potrebbe sottostimare la tossicità di sostanze molto lipofile (per il mancato raggiungimento dell'equilibrio tra le fasi pesce/acqua) e con modo d'azione specifico (per il mancato manifestarsi di effetti ritardati).

Pur superando il problema etico e quello di disporre di grandi volumi di estratto acquoso, non si possono comunque sottovalutare le difficoltà pratico-logistiche poste dai suddetti test, se applicati ai rifiuti, relative alla necessità di allestire vasche per il mantenimento e riproduzione di pesci e di assicurare competenze tecniche specifiche degli operatori.

Promettenti sono i modelli *in vitro* basati su cellule primarie (es. branchiali) o linee cellulari di pesce, che oltre a ridurre o eliminare l'uso di animali, consentono di indagare i meccanismi di tossicità a livello cellulare. L'utilizzo di questi modelli, come strumento rapido ed economico di valutazione ecotossicologica alternativo ai test tradizionali, è ancora oggetto di studio al fine di definirne la capacità predittiva degli effetti *in vivo*.

Il test con il batterio marino luminescente *Vibrio fischeri* (22), per la sua rapidità e possibilità di automatizzazione, è largamente utilizzato nelle indagini ambientali. Dopo un'esposizione di 30 minuti alla soluzione in esame, gli effetti tossici acuti sui batteri sono misurati in termini di inibizione dell'emissione di bioluminescenza ed espressi come EC₅₀. Il test era incluso nella batteria di base, insieme con quello su alghe unicellulari e *Daphnia magna*, oggetto del ring test europeo organizzato dall'Agenzia ambientale federale tedesca (23) condotto su lisciviati di tre matrici di rifiuto (ceneri, suolo e rifiuti legnosi) e, anche in base ai risultati ottenuti, gli stessi test acquatici erano stati raccomandati a livello comunitario come

² I test citati e relativi metodi sono da considerarsi esemplificativi e pertanto non rappresentano una lista esaustiva o raccomandata.

batteria minima per la caratterizzazione ecotossicologica dei rifiuti (24). Anche se il test con batteri luminescenti come sostituto di quello con pesci richiede un'approfondita discussione su tavoli internazionali, si ritiene che possa comunque rimanere un valido candidato come test di screening nella strategia sperimentale, in considerazione delle esperienze maturate e del buon livello di validazione.

Per i crostacei, una conveniente alternativa al test di riproduzione con *Daphnia magna* è rappresentata dal test di riproduzione con *Ceriodaphnia dubia* (25), un altro cladocero che, avendo un ciclo vitale più breve, fornisce analoghe informazioni in soli 7 giorni e, per le sue minori dimensioni, necessita di un volume di soluzione minore. Il test è stato applicato con successo ai lisciviati di rifiuti, rivelando talvolta anche una sensibilità maggiore di quello con *Daphnia magna* (25), ed è stato utilizzato come test addizionale nel succitato ring test europeo con i rifiuti, anche se il numero limitato di prove non ha consentito un'analisi conclusiva (26).

Uno studio statistico francese (27) ha analizzato i risultati di una batteria di due test su fase solida (*L. sativa*: 14 giorni; *E. fetida*: 14 giorni) e quattro test su estratto acquoso (*Daphnia magna*: 48 ore; *Ceriodaphnia dubia*: 7 giorni; *Pseudokirchneriella subcapitata*: 72 ore; *Vibrio fischeri*: 30 min), condotti su numerose tipologie di rifiuto, al fine di valutarne l'adeguatezza per l'attribuzione della proprietà H14. Lo studio ha concluso che la batteria poteva essere ottimizzata riducendola ai test con *V. fischeri*, *C. dubia*, *L. sativa*.

Nel caso di campioni con alta conducibilità, l'uso di organismi marini o eurialini è più appropriato poiché possono sopportare salinità elevate che sarebbero letali alle specie di acqua dolce. Per i crostacei copepodi è disponibile un metodo ISO per il test di tossicità acuta a 48 ore (28), mentre per la tossicità cronica è di prossima adozione un documento guida OECD (29) su un copepode arpacticoide, che ha però una durata eccessiva (36 giorni) per essere applicato alla caratterizzazione dei rifiuti e inoltre il metodo ha rivelato problemi di standardizzazione. Promettenti per l'applicazione ai rifiuti sono i test (sub)cronici condotti su stadi larvali in grado di misurare in sei giorni gli effetti sullo sviluppo delle larve e sopravvivenza dell'arpacticoide *Nitocra spinipes* (6) o in sette giorni l'immobilizzazione dei nauplii, in tutti i suoi stadi, del calanoide *Acartia tonsa* (30, 31).

Un consumatore primario (non crostaceo) che merita considerazione come modello sperimentale è il rotifero di acqua dolce *Brachionus calyciflorus*, organismo microscopico ubiquitario con un sistema metabolico complesso e una buona risposta alle sostanze chimiche. La rapida riproduzione partenogenetica consente l'esecuzione di un test di inibizione della crescita di popolazione, che copre almeno tre cicli riproduttivi in sole 48 ore e con volumi di estratto ridotti (32).

Anche per quanto riguarda i rifiuti, le evidenze sperimentali con ceneri di varia origine e invecchiamento confermano che i test (sub)cronici forniscono risposte più sensibili di quelli acuti (6).

Considerazioni conclusive

L'approccio sperimentale alla classificazione di pericolo per l'ambiente acquatico indicato nell'ADR presenta difficoltà applicative se adottato per la caratterizzazione dei rifiuti e richiede adattamenti e modifiche.

In primo luogo deve essere affrontato il problema posto dalla sperimentazione con i pesci. Gli aspetti etici sono superabili con l'uso di stadi vitali non protetti, ma rimangono punti aperti il trasferimento della metodologia a matrici complesse quali estratti di rifiuti e gli ostacoli di ordine pratico discussi sopra. Rimane da vagliare la possibilità di sostituzione dei test con pesci con altri modelli/metodi alternativi.

Per la classificazione di pericolo cronico dei rifiuti è importante disporre di strumenti agili, con buona capacità predittiva e ragionevolmente praticabili sul territorio nazionale. Possibili candidati alla sostituzione dei test cronici convenzionali indicati nell'ADR sono i test (sub)cronici a breve termine che, utilizzando specie a ciclo vitale breve e/o stadi vitali precoci maggiormente suscettibili alle sostanze chimiche, sono in grado di misurare effetti letali e subletali in un arco di tempo ridotto, con conseguente riduzione di costi. Bisogna comunque aver presente che la riduzione dei tempi di esposizione potrebbe sottostimare la tossicità dei prodotti di degradazione che si formano più lentamente e delle sostanze bioaccumulabili. È fondamentale che siano messe a punto nuove procedure condivise di preparazione del campione da sottoporre ai test ecotossicologici e siano fornite raccomandazioni sull'adozione di misure volte a prevenire, prima e durante il test, la perdita delle sostanze in soluzione e l'insorgere di condizioni che possono inficiarne i risultati. È inoltre necessario ampliare le esperienze specifiche di applicabilità dei test, tradizionali e non, a varie tipologie di rifiuto al fine di implementare il necessario processo di validazione.

Bibliografia

1. Europe. European Commission Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the Council of 19 November 2008 on waste and repealing certain Directives. *Official Journal of the European Union* L 312/3, 22 November 2008.
2. Italia. Legge 24 marzo 2012, n. 28. Conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 25 gennaio 2012, n. 2, recante misure straordinarie e urgenti in materia ambientale. *Gazzetta Ufficiale* n. 71, 24 marzo 2012.
3. United Nations Economic Commission for Europe – Committee on Inland Transport. ADR. *European Agreement concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Road. ECE/TRANS/215 (vol. I)*. New York, Geneva: United Nations, 2010.
4. Europa. Regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 353, 31 dicembre 2008.
5. Istituto Superiore di Sanità, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale. *Parere ISPRA/ISS sulla classificazione dei rifiuti ai fini dell'attribuzione della caratteristica di pericolo H14 "Ecotossico"*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011. (Prot. n. 40832 del 29/09/2011). Disponibile all'indirizzo: http://www.iss.it/binary/ampp/cont/Ecotx_rf.pdf; ultima consultazione 15/12/14.
6. Stiernström S, Hemström K, Wik O, Carlsson G, Bengtsson, B-E, Breitholtz M. An ecotoxicological approach for hazard identification of energy ash. *Waste Management* 2011;(31(2):342-352.
7. EFSA. Opinion of the scientific panel on plant health, plant protection products and their residues on a request from EFSA related to the assessment of the acute and chronic risk to aquatic organisms with regard to the possibility of lowering the uncertainty factor if additional species were tested. (question no. EFSA-Q-2005-042). Adopted on 14 December 2005. *EFSA Journal* 2005;301:1-45.
8. Europa. Regolamento n. 440/2008 della Commissione del 30 maggio 2008 che istituisce dei metodi di prova ai sensi del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 142, 31 maggio 2008.
9. Organisation for Economic Co-operation and Development. *OECD 203. Fish, Acute Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. Paris: OECD Publishing; 1992.

10. Organisation for Economic Co-operation and Development. *OECD 202. Daphnia sp. Acute Immobilisation Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. Paris: OECD Publishing; 2004.
11. European Chemicals Agency. *Guidance on the application of the CLP criteria. Guidance to Regulation (EC) No 1272/2008 on classification, labelling and packaging (CLP) of substances and mixtures. Version 4.0*. Helsinki, Finland: ECHA; 2013.
12. European Chemicals Agency. *Guidance on information requirements and chemical safety assessment. Chapter R.7b: Endpoint specific guidance*. Version 1.1. Helsinki, Finland: ECHA; 2008.
13. OECD 201. *Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*, OECD Publishing; 2011.
14. Unione Europea. Regolamento n. 286/2011 della Commissione del 10 marzo 2011 recante modifica, ai fini dell'adeguamento al progresso tecnico e scientifico, del regolamento (CE) n. 1272/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 83, 30 marzo 2011.
15. Organisation for Economic Co-operation and Development. *OECD 221. Lemna sp. Growth Inhibition Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. Paris: OECD Publishing; 2006.
16. Organisation for Economic Co-operation and Development. *OECD 210. Fish, Early-Life Stage Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. Paris: OECD Publishing; 1992.
17. Commissione Europea. Regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 18 dicembre 2006, concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'Agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE della Commissione. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 136, 29 maggio 2007.
18. Organisation for Economic Co-operation and Development. *OECD 211. Daphnia magna Reproduction Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. Paris: OECD Publishing; 2012.
19. Unione Europea. Direttiva 2010/63/UE del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali adottati ad usi scientifici. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 276, 20 ottobre 2010.
20. Organisation for Economic Co-operation and Development. *OECD 236. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. Paris: OECD Publishing; 2013.
21. Organisation for Economic Co-operation and Development. *OECD 212. Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*. Paris: OECD Publishing; 1998.
22. UNI EN ISO 11348. *Qualità dell'acqua: Determinazione dell'effetto inibitorio di campioni acquosi sull'emissione di luce di Vibrio fischeri (prova su batteri luminescenti). Parte 1: Metodo con batteri preparati di fresco. Parte 2: Metodo con batteri gelificati. Parte 3: Metodo con batteri liofilizzati*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2001.
23. Moser H, Römbke J (Ed.). *Ecotoxicological characterization of waste - results and experiences of an international ring test*. New York: Springer; 2009.
24. European Committee for standardization. *Characterization of waste. Guidance on the use of ecotoxicity tests applied to waste*. Brussels: CEN; 2010. (Technical report ONR CEN/TR 16110).

25. Ferrari B, Radetski MC, Veber AM, Ferard JF. Ecotoxicological assessment of solid wastes: a combined liquid- and solid-phase testing approach using a battery of bioassays and biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1999;18(6):1195-202.
26. Moser H, Roembke J, Donnevert G, Becker R. Evaluation of biological methods for a future methodological implementation of the Hazard criterion H14 'ecotoxic' in the European waste list (2000/532/EC). *Waste Management & Research* 2011;29(2):180-7.
27. Pandard P, Devillers J, Charissou AM, Poulsen V, Jourdain MJ, Férard J-F, Grand C, Bispo A. Selecting a Battery of Bioassays for Ecotoxicological Characterization of Wastes. *Science of the Total Environment* 2006;363(1-3):114-125.
28. ISO 14669. *Water quality - Determination of acute lethal toxicity to marine copepods(Copepoda, Crustacea)*. Geneva: International Organization for Standardization; 1999.
29. OECD. *New guidance document on Harpacticoid Copepod development and reproduction test with Amphiascus. Series on Testing and Assessment No. 201*. Paris: OECD Publishing; 2014. (ENV/JM/MONO(2014)17)
30. UNICHIM Pr M.U. 2366. *Qualità dell'acqua - Determinazione dell'inibizione della mobilità di naupli di Acartia tonsa Dana (Crustacea: Copepoda) dopo 7 giorni di esposizione*. Milano: Associazione per l'Unificazione nel Settore dell'Industria Chimica; 2010.
31. Gorbi G, Invidia M, Savorelli F, Faraponova O, Giacco E, Cigar M, Buttino I, Leoni T, Prato E, Lacchetti I, Sei S. Standardized methods for acute and semichronic toxicity tests with the copepod *Acartia tonsa*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2012;31:2023-8.
32. ISO 20666. *Water quality - Determination of the chronic toxicity to Brachionus calyciflorus in 48 h*. Geneva: International Organization for Standardization; 2008.

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di dicembre 2014, 11° Suppl.*

*Stampato in proprio
Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità
Roma, dicembre 2014*