



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

*Roma, 13 maggio 2015*

# **La normativa ADR per la caratteristica di pericolo “Ecotossico” ed i metodi di analisi**

*Daniela Conti - Andrea Paina*

*ISPRA Servizio AMB LAB*

*Seminario ISPRA “La nuova classificazione dei rifiuti”*



# ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

## ***Legge 28 del 24/03/2012***

*“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 9 M6 («Materie pericolose per l’ambiente acquatico, liquide») e M7 («Materie pericolose per l’ambiente acquatico, solide»).*



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

## Norme tecniche di riferimento precedenti

*EN 14735:2005 Characterization of waste. Preparation of waste samples for ecotoxicity tests*

*EN 12457-2:2002 - Characterisation of waste. Leaching. Compliance test for leaching of granular waste materials and sludges. One stage batch test at a liquid to solid ratio of 10 l/kg for materials with particle size below 4 mm (without or with size reduction)*



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

**Problema di  
rappresentatività del  
campione di rifiuto**

## I nuovi limiti di riferimento

Determinazione ecotossicologica	ADR (limiti - categoria cronico 2)	CLP (limiti - categoria cronico 3)
LC <sub>50</sub> a 96 con <b>pesci</b> (Metodo C1 reg. CE/440/2008)	≤10mg/L	≤100mg/L
EC <sub>50</sub> 48h con <b>crostacei</b> (Metodo C2 reg. CE/440/2008)	≤10mg/L	≤100mg/L
E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> 72-96h con <b>alghe</b> (Metodo C3 reg. CE/440/2008)	≤10mg/L	≤100mg/L



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

## WAF e loading rate

### **Water-accommodated fraction (WAF):**

An aqueous fraction containing the dissolved and/or suspended and/or emulsified fraction of a multi-component substances or a mixture.

### **Loading rate:**

The ratio of test material to water (in mg/l) used in the preparation of a WAF.

Il loading rate può essere considerato analogo alla “concentrazione nominale”.



## Determinazione del campione minimo

### Equazione di Gy

$$m = \frac{1}{6} \pi \times d^3 \times \rho_d \times g \times \frac{(1-p)}{(VC)^2 \times p}$$

Forma

s = 0,5

Densità

$\rho = 1,5$

Distribuzione granulometrica ampia

g = 0,5

Elevata eterogeneità

p = 0,001

Incertezza

20%

Granulometria ( $\mu\text{m}$ )	250	125
Massa “m” del campione di rifiuto (mg)	80	10



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

## Modalità di preparazione di un WAF

Rapporto L/S variabile

Agente lisciviante: acqua distillata, demineralizzata, deionizzata o di purezza equivalente.  $5 < \text{pH} < 7,5$ ,  $\text{cond} < 5 \mu\text{S}/\text{cm}$

Contenitori in vetro in HDPE o PP in accordo a EN ISO 5667-3

Agitazione (5-10 rpm) per un periodo di  $24 \pm 0,5$  h, a temperatura compresa tra 15 e 25°C; miscelatore a rovesciamento (5-10 rpm) o agitatore a rotazione (10 rpm).

Sedimentazione dell'estratto acquoso su un piano orizzontale per almeno  $15 \pm 5$  minuti.

Filtrazione su membrana  $0,45 \mu\text{m}$  (filtri in PTFE o nylon).

<b>Rifiuto</b>	<b>CEE</b>	<b>granulometria</b>	<b>N° prove</b>	<b>Test</b>	<b>WAFs (loading rate- Ir)</b>
Ceneri pesanti e scorie da incenerimento	19.01	<4mm	4	D;V	3 prove a 100 g/L (L/S 10:1) 1 prova 100 mg/L (L:S - 10.000:1)
Ceneri pesanti e scorie da incenerimento	19.01	<250µm	7	D;V;A	100 mg/L
Ceneri pesanti e scorie da incenerimento	19.01	<125µm	5	D	4,6 mg/L 10 mg/L 22 mg/L 46 mg/L 100 mg/L
Ceneri pesanti e scorie da incenerimento	19.01	<125µm	3	D	100 mg/L
Rifiuti solidi da abbattimento fumi	19.01.07*	<90µm	6	D;V	10 mg/L (L/S 100.000:1)
Suolo contaminato	17.05.03 *	200<250µm	31	D;V;A	100 mg/L
Carboni attivi esauriti	19.01.10*	<250µm	2	D;V	100 mg/L
Suolo contaminato	17.05.03 *	<250µm	2	D;V	100 mg/L
Fango da scrubber	19.02	<250µm	2	D;V	100 mg/L
Sedimento lagunare	17.05	<250µm	2	D;V	100 mg/L
Car-fluff	19.10	<250µm	2	D;V	100 mg/L
Ceneri pesanti e scorie da incenerimento	19.01	<250µm	8	D;V	100 mg/L

D= Daphnia; V= Vibrio; A =Alghe



## Esecuzione di un test limite

I protocolli previsti dai metodi C1 (pesci), C2 (*Daphnia*) e C3 (alghe) del reg CE 440/2008, prevedono la possibilità di effettuare un saggio limite

### *SAGGIO LIMITE*

*Usando le procedure descritte dal metodo di prova, si può eseguire un saggio limite a 100 mg/l della sostanza di prova [...] allo scopo di dimostrare che la  $EC_{50}$  si colloca al di sopra di questa concentrazione.*

Se si verifica:

- ✓ mortalità (pesci),
- ✓ immobilizzazione (*Daphnia*),
- ✓ una diminuzione media del 25 % o più nella biomassa o nel tasso di crescita rispetto il controllo (alghe),

SI DEVE ESEGUIRE UNO STUDIO COMPLETO.



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

## Conclusioni dello studio di fattibilità

Messa a punto della procedura di preparazione del campione di rifiuto

Notevole difficoltà nell'evidenziare, nelle condizioni stabilite, un effetto tossico nei campioni di rifiuto analizzati.

Test effettuati sui medesimi rifiuti, secondo le procedure della EN 14735:2005, hanno rilevato tossicità.

Nelle condizioni in cui si è evidenziata tossicità, la variabilità è stata molto ampia



# Studio collaborativo ISPRA SC007

## SCOPO DELLO STUDIO

Definire i parametri di ripetibilità e riproducibilità della procedura comprendente la preparazione di estratti acquosi di rifiuto (WAFs) con loading rate 100 mg/L da un rifiuto solido (distribuito come materiale di riferimento RM050) e la successiva esecuzione di test ecotossicologici con i sistemi di saggio: alghe d'acqua dolce della specie *Pseudokirchneriella subcapitata* e crostacei d'acqua dolce della specie *Daphnia magna*.



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

# PARTECIPANTI

Allo studio collaborativo hanno aderito 25 laboratori:

22 laboratori ARPA/APPa (individuati da ISPRA AMB LAB e dalla Rete dei Referenti ARPA/APPa a supporto dell'organizzazione dei confronti interlaboratorio)

3 laboratori privati

Tutti esperti nell'esecuzione di saggi ecotossicologici con *P. subcapitata* e *D. magna*.

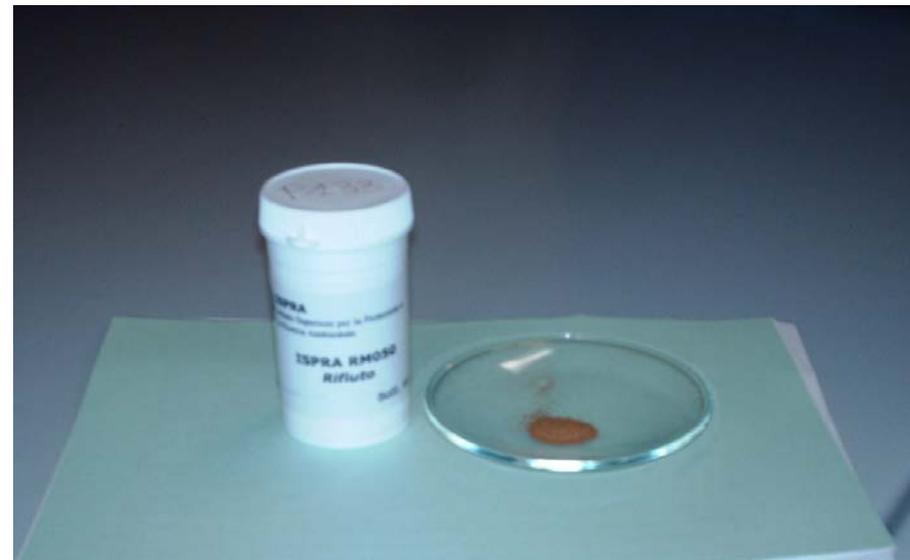


# ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

## MATERIALE DI PROVA

- ISPRA RM050 è costituito da un rifiuto (suolo contaminato) contenente elementi in tracce (metalli) e proveniente da un'area industriale del Centro Italia.
- Granulometria  $\leq 250 \mu\text{m}$  (distribuzione cumulativa  $> 95\%$ ).
- Omogeneizzazione del materiale e prove di omogeneità



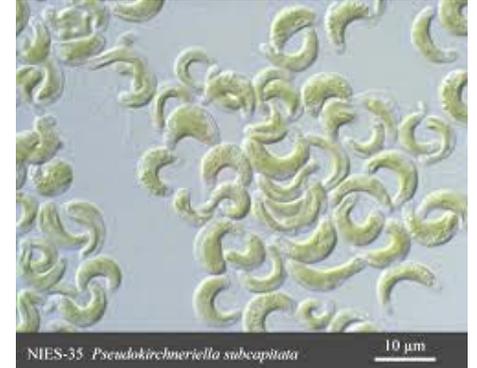


**ISPRA**

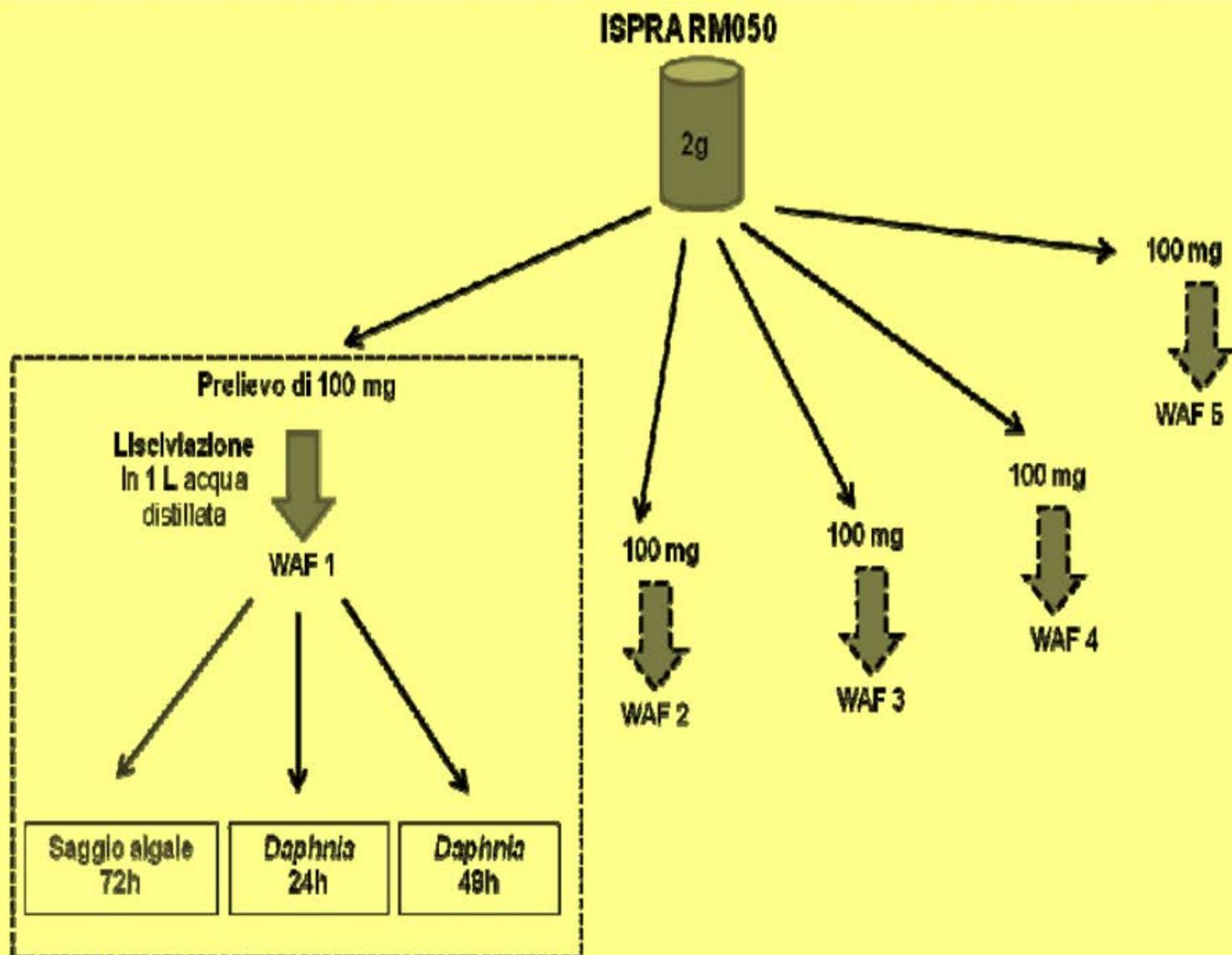
Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

## SISTEMI DI SAGGIO

- Colture algali di *Pseudokirchneriella subcapitata* in crescita esponenziale (allevamenti o alghe immobilizzate in matrice)
- Neonati del crostaceo d'acqua dolce *Daphnia magna* ( $\leq 24$  ore di età) (allevamenti o forme criptobiotiche)



# DISEGNO SPERIMENTALE





**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

# Saggi di tossicità

## Saggio algale → Metodo UNI EN ISO 8692:2012

La risposta dell'alga *P. subcapitata* (72±2 ore ) è valutata come inibizione della crescita (Ir %) e misurata come riduzione del tasso di crescita rispetto al controllo.

## Saggio con *Daphnia magna* → Metodo UNI EN ISO 6341:2013

La risposta dei neonati (< 24 h età) di *Daphnia* (24 e 48 ore) è valutata come inibizione della mobilizzazione e misurata come percentuale di organismi immobili nel campione di prova (percentuale di effetto) al termine di ogni singolo periodo di esposizione.





**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

## 23/25 laboratori (92%) hanno restituito i risultati

- **Valutazione preliminare dei dati dei laboratori**
- **Elaborazione statistica dei risultati** - applicazione dei **test statistici di Grubb e Cochran** per la verifica di valori dubbi (*struggler*) e anomali (*outlier*) sia per le medie che per le varianze (intra-laboratorio); **test secondo la statistica h e k (Mandel)**, per valutare graficamente la consistenza statistica dei risultati dei laboratori (intra e inter laboratorio).
- **Calcolo della ripetibilità  $S_r$  % e della riproducibilità  $S_R$  % secondo ISO 5725-2**

# Test con Daphnia

Valutazione della tossicità: **22 laboratori**: (1 lab escluso perché non ha rispettato i criteri di validità del test)

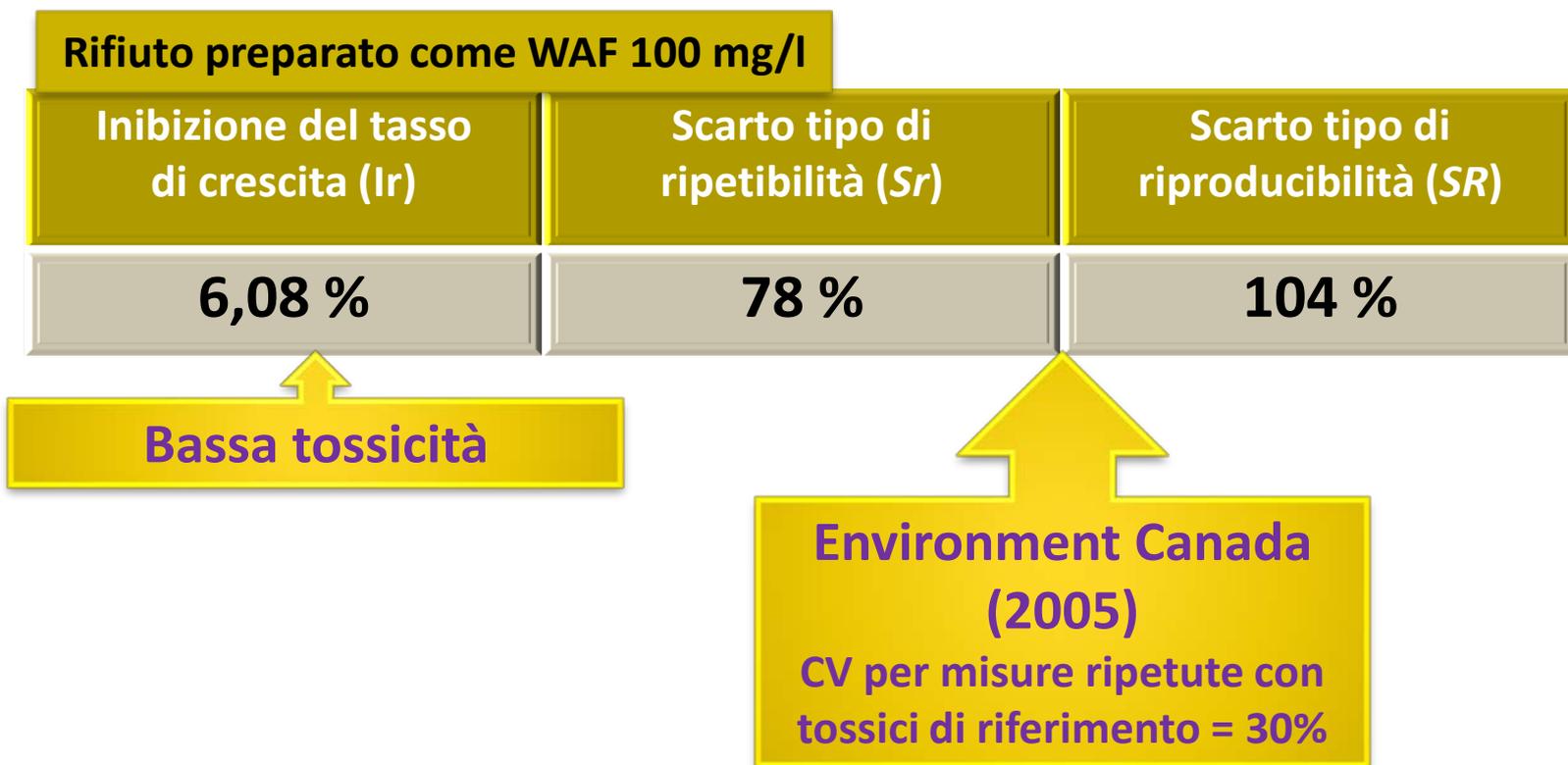
Rifiuto preparato come WAF 100 mg/l			
% effetto 24 h	CV %	% effetto 48 h	CV %
1,82	137,51	8,26	96,71

**Tossicità < 10%**

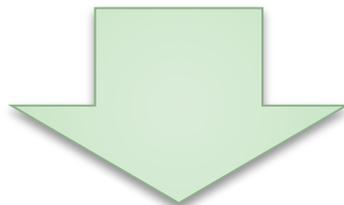
Le elaborazioni statistiche non sono state eseguite poiché i risultati sono stati tali da rendere non applicabili le procedure di calcolo della ripetibilità e della riproducibilità (in accordo alla norma ISO-5725-parte 2).

# Test algale

Il calcolo di  $Sr\%$  e  $SR\%$  ha riguardato il solo il test algale: **20 laboratori** (2 lab non hanno rispettato i criteri di validità del test; 1 lab outlier)



Sebbene la procedura ISPRA applicata nello studio SC007, sia coerente con la normativa ADR vigente, essa, come dimostrato, non è risultata né ripetibile, né riproducibile nelle nostre condizioni sperimentali.

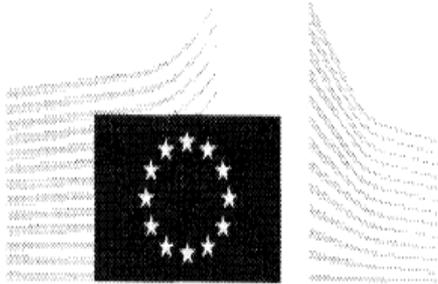


- La quantità di rifiuto (10- 100 mg) garantisce la rappresentatività del rifiuto stesso?
- I test proposti sono adeguati a rilevare la tossicità alle concentrazioni di rifiuto proposte (10-100 mg) ?
  - (es. alga; alcuni Paesi hanno infatti provato altri test)
- La procedura di preparazione del campione di rifiuto deve essere riconsiderata?

# “Il dopo” Ecomondo e Livorno 2014

- **Gruppo di studio *ad hoc* su H14** (approccio ecotossicologico), coordinato da ISPRA AMB LAB, con la partecipazione di:
- Marco Francese (SHORELINE) per i laboratori privati
- Renato Baudo in qualità di esperto (ecotossicologia e batterie di test)

# Studio Europeo



EUROPEAN COMMISSION  
DIRECTORATE-GENERAL  
ENVIRONMENT  
Directorate A - Green Economy  
ENV.A.2 - Waste Management & Recycling

Brussels, **19. 11. 2014**  
MCA/mc env.a.2(2014) 4224729

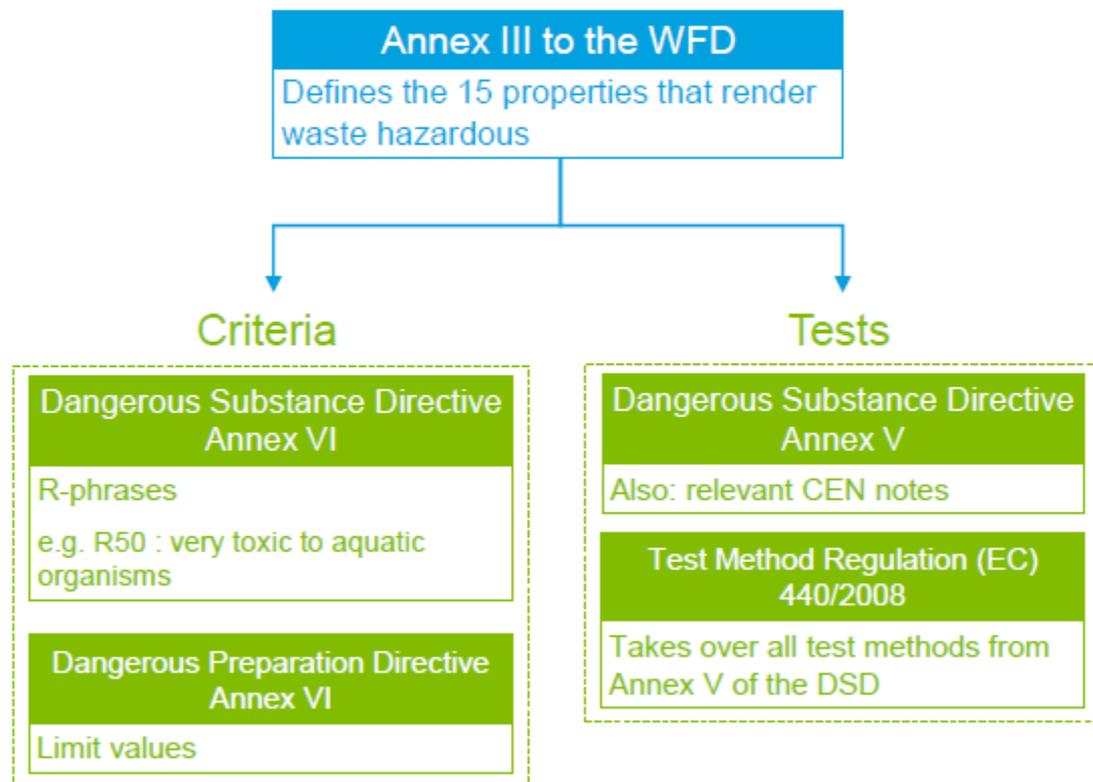
**Subject: Request to cooperate with BIO by Deloitte and Ineris in a study undertaken by DG Environment to assess the impacts of different classification approaches for hazard property "H 14" on selected waste streams**

MS	Legislation	Guidelines
IT - Italy	Legislative decree 22/97	Ispra (2012) batterie di test per la caratterizzazione ecotossicologica dei rifiuti : Stato dell'arte

MS	Legislation	Guidelines
IT - Italy	<p data-bbox="672 511 1219 615"><u>Legislative decree 152/2006</u> (part IV) It replaces the legislative decree 22/97.</p> <p data-bbox="672 796 1219 1072">-Law 28/2012 has introduced criteria for H14 assessment into legislative decree 152/2006 (see point 5,Annex D at part IV)</p> <p data-bbox="672 1139 1219 1410">- ADR agreement (European Agreement Concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Road), Class 9, M6 and M7.</p>	No guidelines

# Context of the project

## A strong link with chemical legislation



*Progressively being repealed by the CLP and REACH Regulation (1<sup>st</sup> June 2015)*

However :

- At EU level, no guidelines or recommendations exist for a specific methodology for the assessment of H 14.
- As a result, H 14 is assessed in different ways throughout Member States.

# Objectives of the project

## Method 1

IF:  
 $c(H420) \geq 0.1\%$   
OR  
 $\Sigma c(H400) \geq 25\%$

OR  
 $(100 \times \Sigma c H410) + (10 \times \Sigma c H411) + (\Sigma c H412) \geq 25\%$   
OR  
 $\Sigma c H410 + \Sigma c H411 + \Sigma c H412 + \Sigma c H413 \geq 25\%$

→ waste hazardous

## Method 2

IF:  
 $c(H420) \geq 0.1\%$   
OR

If  $c(H400) \geq 0.1/M\%$  and  $\Sigma (c H400 \times M) \geq 25\%$   
OR

If  $c(H410) \geq 0.1/M\%$  and  $c(H411) \geq 1\%$  and  
 $\Sigma (M \times 10 \times c H410) + \Sigma c H411 \geq 25\%$

→ waste hazardous

## Method 3

IF:  
 $c(H420) \geq 0.1\%$   
OR  
 $\Sigma (c H410) \geq 0.1\%$   
OR  
 $\Sigma (c H411) \geq 2.5\%$   
OR  
 $\Sigma (c H412) \geq 25\%$   
OR  
 $\Sigma (c H413) \geq 25\%$

→ waste hazardous

## Method 4

IF:  
 $c(H420) \geq 0.1\%$   
OR  
 $\Sigma (c H410) \geq 2.5/M\%$   
OR  
 $\Sigma (c H411) \geq 2.5\%$

→ waste hazardous

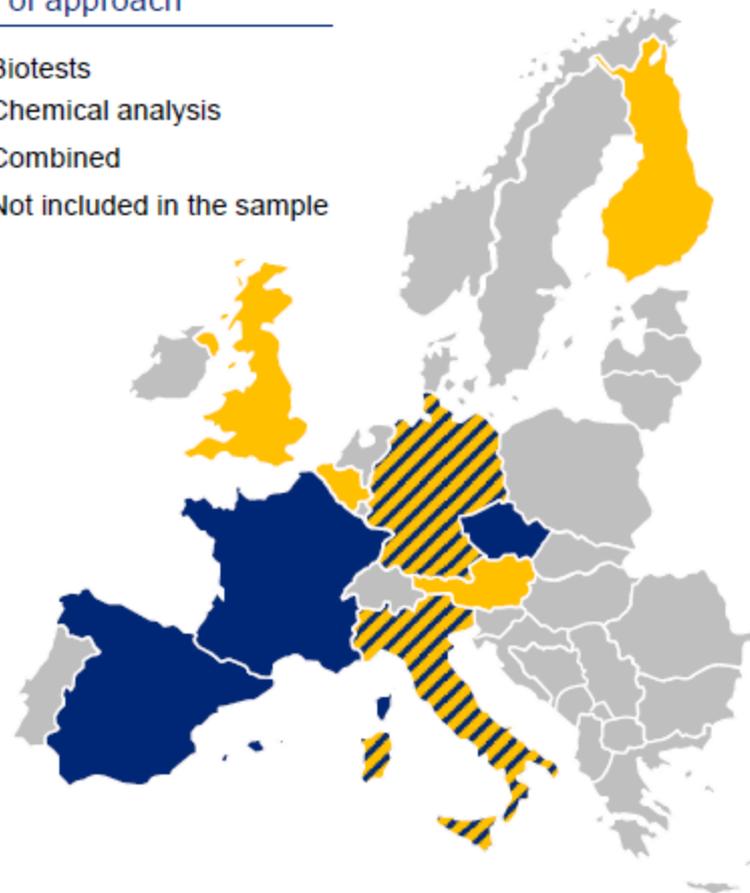
# Approaches in nine Member States

## Overview

	Law	Guidelines
Austria	X	
Belgium		X
Czech Republic	X	X
Finland		X
France		X
Germany		X
Italy	X	
Spain	X	X
UK		X

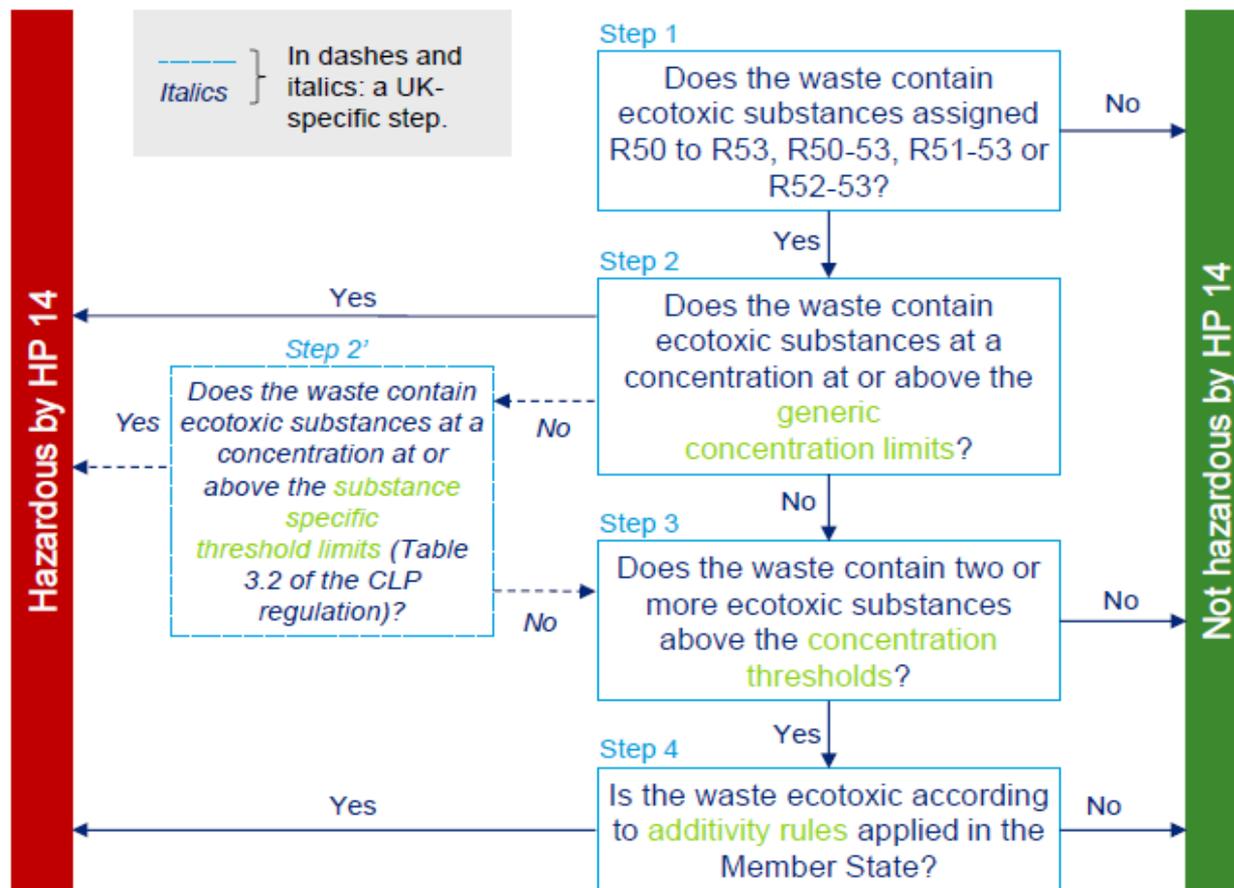
### Type of approach

- Biotests
- Chemical analysis
- Combined
- Not included in the sample



# Approaches in nine Member States

Based on chemical analyses: the DPD as a reference



# Batteries of tests used in Member States

Member State	Aquatic tests		Terrestrial tests	
	Organism	Standard	Organism	Standard
Czech Republic	<i>Daphnia magna</i>	ISO 6341	None	
	<i>Sinapis alba</i>	Czech guidelines		
	<i>Desmodesmus subspicatus</i>	ISO 8692		
	<i>Poecilia reticulata</i>	ISO 7346-2		
France (initial strategy) <sup>1</sup>	<i>Daphnia magna (acute)</i>	ISO 6341	<i>E. fetida (acute)</i>	ISO 11 268-1
	<i>Vibrio fischeri</i>	ISO 11348-3	<i>Lactuca sativa</i>	ISO 11269-2
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	NF EN ISO 8692		
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	NF ISO 20665		
	<i>Brachionus calyciflorus</i>	NF ISO 20666		
France (hybrid strategy combining initial strategy and German strategy)	<i>Daphnia magna (acute)</i>	ISO 6341	<i>E. fetida (avoidance)</i>	ISO 17512-1
	<i>Vibrio fischeri</i>	ISO 11348-3	<i>Avena sativa / Brassica rapa</i>	ISO 11269-2
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	NF EN ISO 8692	<i>Arthrobacter globiformis</i>	ISO/DIS 18187

Member State	Aquatic tests		Terrestrial tests	
	Organism	Standard	Organism	Standard
Spain	<i>Vibrio fischeri</i>	ISO 11348	None	
	<i>Daphnia magna</i>	ISO 6341		
Germany	<i>Daphnia magna (acute)</i>	ISO 6341	<i>E. fetida</i>	ISO 17512-1
	<i>Daphnia magna (chronic)</i>	ISO 10706	<i>E. fetida (chronic)</i>	ISO 12 268-1
	<i>Vibrio fischeri</i>	ISO 11348-1/2/3	<i>Brassica rapa</i>	ISO 11269-2
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata / Desmodesmus subspicatus</i>	NF EN ISO 8692	<i>Arthrobacter globiformis</i>	ISO/DIS 18187
	<i>Lemna minor</i>	ISO 20079	<i>Folsomia candida (chronic)</i>	ISO 11267
Italy	<i>Daphnia magna (acute)</i>	ISO 6341	None	
	<i>Vibrio fischeri</i>	ISO 11348		
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata and Desmodesmus subspicatus</i>	ISO 8692		

*Invertebrate*  
*Plant*  
*Micro-organisms*

*Algae*  
*Fish*

} Acute and chronic endpoints



I due approcci – chimico e biologico – si complementano a vicenda.

Quando è possibile determinare la composizione del rifiuto, l'ecotossicità può essere derivata dall'analisi chimica e quindi i *biotest* non sono necessari. Se il campione di rifiuto è troppo complesso e rimane chimicamente indeterminato, l'uso dei *biotest* permette comunque di classificarlo dal punto di vista dell'ecotossicità.

Non ci sono valori limite o valori soglia armonizzati e nemmeno batterie di test armonizzate.

E' stato evidenziato dal Regno Unito che, in alcuni casi, i risultati derivanti dai due approcci (chimico e biologico) sono discordanti .

Recentemente, per la valutazione della proprietà di pericolo “Ecotossico”, gli approcci combinati sono stati investigati dai ricercatori come **alternativa promettente allo *status quo***.

Possible combination of  
chemical analysis and  
biotests?

# Comparison of waste classification according to chemical composition and experimental approach

Waste	Chemical approach				Experimental approach	
	M1	M2	M3	M4	Aquatic battery	Terrestrial battery
Soil contaminated with heavy metals 170503*/170504	HW	HW	HW	HW	HW	HW
PAH contaminated soil 170503*/170504	NH	NH	NH	NH	NH	NH
Bottom ash #1	HW	HW	HW	HW	HW	HW
Bottom ash #2	NH	NH	HW	NH	NH	HW
Bottom ash #3	HW	NH	HW	NH	HW	NH
Fly ash	HW	HW	HW	NH	HW	HW

# Test battery and proposed threshold values considered to classify wastes

Test	Proposal of threshold values	Duration	Standard
Inhibition of the mobility of <i>Daphnia magna</i> ( <b>Dap</b> )	EC50 ≤ 10%	48 h	ISO 6341
Inhibition of the light emission of <i>Vibrio fischeri</i> (Luminescent bacteria test) ( <b>Vib</b> )	EC50 ≤ 10%	30 min	ISO 11348-3
Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae ( <b>Alg</b> )	EC50 ≤ 10%	72 h	ISO 8692
Solid contact test using the dehydrogenase activity of <i>Arthrobacter globiformis</i> ( <b>Art</b> )	EC50 ≤ 10%	2 h	ISO/DIS 18187
Effects on the emergence and early growth of higher plants ( <i>Avena sativa</i> , <i>Brassica napus</i> ) ( <b>Ave, Bra</b> )	EC50 ≤ 10%	14 d	ISO 11269-2
Avoidance test with earthworms ( <i>Eisenia andrei/fetida</i> ) ( <b>Ear</b> )	EC50 ≤ 10%	48 h	ISO 17512-1

# Possible combination of chemical and experimental approaches?

- **According to CLP rules**

*The approach for classification of aquatic environmental hazards is tiered, and is dependent upon the type of information available for the mixture itself and for its components. Elements of the tiered approach include:*

- ✓ *classification based on tested mixtures;*
- ✓ *classification based on bridging principles;*
- ✓ *the use of 'summation of classified components' and/or an 'additivity formula'.*

- **Alternative approach**

- ✓ Step 1: summation method
- ✓ Step 2 : experimental approach (if waste is not classified according to step 1)

If the composition of the waste is unknown or complex, biotests are applied. The testing strategy includes a test battery with terrestrial and aquatic tests



## The evaluation of an analytical protocol for the determination of substances in waste for hazard classification.

Pierre Hennebert, Arnaud Papin, Jean-Marie Padox, Benoît Hasebrouck

► **To cite this version:**

Pierre Hennebert, Arnaud Papin, Jean-Marie Padox, Benoît Hasebrouck. The evaluation of an analytical protocol for the determination of substances in waste for hazard classification.. Waste Management, Elsevier, 2013, 33 (7), pp.1577-88. <10.1016/j.wasman.2013.03.013>. <ineris-00904360>

**HAL Id: ineris-00904360**

**<http://hal-ineris.ccsd.cnrs.fr/ineris-00904360>**

Submitted on 14 Nov 2013



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

# Grazie per l'attenzione

**Daniela Conti, Andrea Paina**

[daniela.conti@isprambiente.it](mailto:daniela.conti@isprambiente.it)

[andrea.paina@isprambiente.it](mailto:andrea.paina@isprambiente.it)