

## ALLEGATO 6

Rapporto finale sulla “Valutazione dei possibili rischi ecotossicologici associati all’utilizzo dell’additivo” effettuato dall’Istituto Mario Negri



# Valutazione dei possibili rischi ecotossicologici associati all'utilizzo dell'additivo condizionante "Rheosoil 143"



## **Dipartimento di Ambiente e Salute**

Unità di Igiene Industriale e Ambientale

Marco Lodi

Diego Baderna

Claudia Cappelli



## **Dipartimento di Biochimica e Farmacologia Molecolare**

Unità di Patologie umane in Organismi modello

Luisa Diomedè

Margherita Romeo

Paolo La Rocca

Gennaio 2013

## Sommario

<b>Obiettivi del progetto di ricerca .....</b>	<b>1</b>
<b>Fasi del progetto di ricerca .....</b>	<b>3</b>
<b>Fase 1: Presa visione delle schede tecniche del prodotto “Rheosoil 143” per la ricerca delle informazioni tossicologiche di base.....</b>	<b>4</b>
<b>Fase 2: Caratterizzazione chimica del prodotto.....</b>	<b>5</b>
<b>Fase 3: Valutazione dell’affinità strutturale dell’additivo condizionante con gli xenobiotici presenti nella tabella 1, allegato 5 del D.Lgs. 152/2006 .....</b>	<b>6</b>
<b>Fase 4: Ricerca delle proprietà chimico-fisiche e tossicologiche .....</b>	<b>11</b>
<b>Fase 5: Studio del potenziale rischio ecotossicologico su modelli animali e vegetali semplificati. ....</b>	<b>15</b>
<b>5.1 Preparazione del terreno modello .....</b>	<b>15</b>
<b>5.2 Studi su <i>C.elegans</i>.....</b>	<b>17</b>
Valutazione della Tossicità di “Rheosoil 143” .....	17
Valutazione della Tossicità del terreno modello addizionato con Rheosoil 143 .....	19
<b>5.3 Valutazione della tossicità acquatica su <i>Daphnia magna</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>Valutazione della tossicità di “Rheosoil 143” .....</b>	<b>21</b>
<b>5.4 Valutazione della tossicità terrestre mediante Fitotest.....</b>	<b>23</b>
Valutazione della fitotossicità di “Rheosoil 143” .....	23
<b>Fase 6: Valutazione della biodegradabilità di “Rheosoil 143” e della variazione della tossicità nel tempo. ....</b>	<b>27</b>
<b>6.1 Studi su <i>C.elegans</i>.....</b>	<b>28</b>
6.2 Risultati su <i>Daphnia magna</i> .....	30
6.3 Valutazione della tossicità terrestre mediante Fitotest.....	31
<b>Sintesi e Conclusioni.....</b>	<b>33</b>

## Obiettivi del progetto di ricerca

Il presente progetto di ricerca ha come obiettivo la valutazione del potenziale rischio per l'ambiente associato all'utilizzo del lubrificante "Rheosoil 143" come rappresentante degli additivi attualmente utilizzati da Autostrade S.p.A.

Il progetto è stato sviluppato mediante:

- Analisi delle informazioni disponibili sul prodotto "Rheosoil 143" e valutazione della "similarità" rispetto agli elementi riportati nella Tabella 1 dell'allegato 5 del D.Lgs 152/2006;
- Valutazione del potenziale rischio ecotossicologico del prodotto "Rheosoil 143" mediante studi condotti su modelli animali e vegetali semplificati, ritenuti rappresentativi degli organismi presenti nell'ambiente.

Nella prima parte dello studio, dopo presa visione della scheda tecnica del prodotto "Rheosoil 143", sono state analizzate le informazioni relative alla composizione chimica, tossicologica ed ecotossicologica di "Rheosoil 143". Sulla base dell'affinità strutturale è stato eseguito un confronto dei principali componenti del prodotto in esame rispetto alle molecole e ai composti di riferimento riportati nella Tabella 1 dell'allegato 5 alla parte IV del D.Lgs/2006. La presenza di un composto affine e/o simile al prodotto in esame permetterebbe infatti di definire una concentrazione limite a cui riferirsi.

Nella seconda parte del progetto sono stati eseguiti dei saggi ecotossicologici per la determinazione della tossicità acquatica o terrestre di "Rheosoil 143", mediante l'impiego dei seguenti modelli biologici:

- *Caenorhabditis elegans*: (*C. elegans*) è un nematode sempre più utilizzato per studi in vivo, in particolare in campo biomedico e nel campo della tossicologia ambientale (Leung MCK et al., *Toxicological Sci.*, 2008), in quanto offre alcune caratteristiche complementari a quelle dei modelli cellulari. *C. elegans* è un vero e proprio organismo animale su cui è possibile condurre studi di tipo comportamentale, di caratterizzazione biochimica dei suoi processi metabolici e studi di tracciabilità genetica. E' noto, per esempio, che alcuni pathways metabolici di *C. elegans*, come la risposta allo stress ossidativo e l'espressione di enzimi antiossidanti e/o detossificanti, sono ben conservati nell'uomo. I valori di LD50 (Lethal Dose 50, la dose di composto che causa la morte del 50% degli animali trattati) ottenuti su *C. elegans* correlano con quelli ottenuti nei roditori, e questo rende lo rende un buon modello sperimentale per predire la tossicità nei mammiferi in modo complementare agli studi in vitro e in vivo (Leung MCK et al., *Toxicological Sci.*, 2008).

- *Daphnia magna*: crostaceo di acqua dolce, utilizzato per la valutazione della tossicità in ambiente acquatico. In particolar modo, il test di immobilizzazione di *Daphnia magna* dopo 48 ore di esposizione ad un composto, è stato descritto dalla linea guida ISO 6341 dell'International Organization for Standardization (ISO) ed è regolato dal D.Lgs 152/2006. Questo test è stato dichiarato idoneo alla valutazione della tossicità secondo i "Metodi analitici per le acque IRSA-CNR, protocollo 8020";
- *Lepidium sativum* (crescione), *Sinapis alba* (senape) e *Sorghum saccharatum* (sorgo): piante superiori, utilizzate per valutare gli effetti di un composto sull'ambiente terrestre in tempi brevi. In particolar modo, sono stati condotti alcuni test per valutare gli effetti di "Rheosoil 143" sull'inibizione della germinazione e sull'allungamento radicale nelle piante superiori. Questi test sono stati descritti dalla linea guida ISO 11269-1.

## Fasi del progetto di ricerca

Il progetto è stato articolato nelle seguenti fasi:

1. Presa visione delle schede tecniche del prodotto “Rheosoil 143” per la ricerca delle informazioni tossicologiche di base già esistenti;
2. Caratterizzazione chimica del prodotto “Rheosoil 143”;
3. Valutazione dell’affinità strutturale dell’additivo condizionante con gli xenobiotici presenti nella tabella 1, allegato 5 del D.Lgs. 152/2006;
4. Ricerca delle proprietà tossicologiche ed ecotossicologiche già esistenti per i principali componenti chimici presenti in “Rheosoil 143” e predizione, mediante modellistica *in silico*, delle proprietà tossicologiche eventualmente mancanti;
5. Studio del potenziale rischio ecotossicologico associato all’esposizione di modelli animali e vegetali semplificati a “Rheosoil 143”;
6. Valutazione della biodegradabilità di “Rheosoil 143”.

## Fase 1: Presa visione delle schede tecniche del prodotto “Rheosoil 143” per la ricerca delle informazioni tossicologiche di base

È stata analizzata la scheda tecnica del prodotto “Rheosoil 143”, commercializzato da BASF, e consegnatoci dal committente ed utilizzato come prototipo di additivo lubrificante per le macchine addette allo scavo.

Le informazioni, riportate nella scheda tecnica versione del 19.3.2012, descrivono il prodotto come una miscela composta principalmente da **tensioattivi anionici in acqua** in cui sono presenti **tracce di formaldeide**.

La scheda tecnica riporta inoltre, la presenza di **sodio lauril-etere solfato** come unico composto rilevante per la sicurezza, ma indica anche la presenza di un valore limite per la formaldeide previsto dall’ Associazione Americana degli Igienisti Industriali (ACGIH) per l’esposizione occupazionale.

BASF segnala il composto come:

- Irritante (frase di pericolo Xi);
- Irritante per la pelle (R38, H315);
- In grado di indurre lesioni oculari gravi (R41, H318).

Per quanto riguarda gli altri parametri di interesse tossicologico, il prodotto viene descritto come **generalmente sicuro** sebbene le singole voci riportate sulla scheda di sicurezza del prodotto “Rheosoil 143” nella maggior parte dei casi, non siano il risultato di dati ottenuti sperimentalmente ma mediante l’utilizzo di metodi alternativi *in silico*, basati sull’ analisi della struttura chimica delle molecole.

In particolare, la scheda tecnica riporta le seguenti affermazioni riguardanti il prodotto:

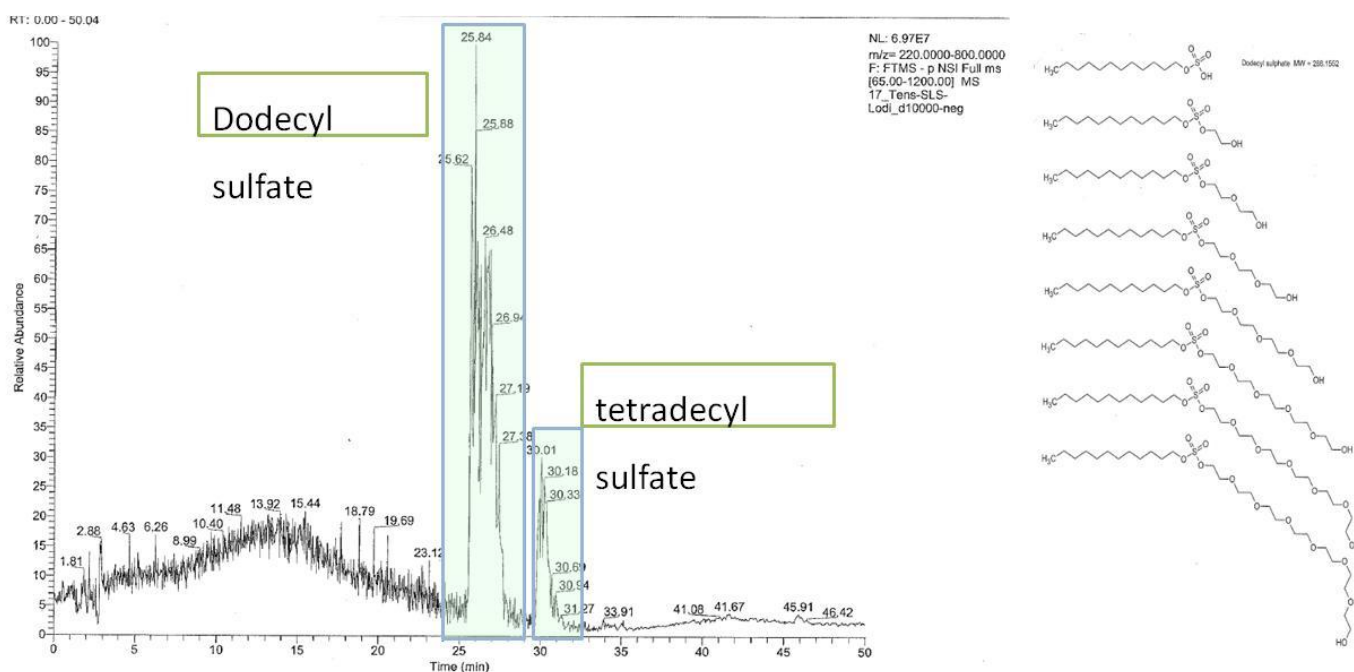
- non è in grado di indurre sensibilizzazione delle vie respiratorie (“non si hanno prove”);
- non è mutageno ne cancerogeno (“la struttura chimica non determina particolari sospetti”);
- non ha effetti sulla tossicità riproduttiva e sullo sviluppo (“la composizione chimica non fa presumere tale effetto e non sono disponibili dati attendibili sulla tossicità per somministrazione ripetuta”);
- non è nocivo per gli organismi acquatici (“in base alle conoscenze attuali non sono da attendersi effetti negativi. Con buona probabilità il prodotto non è nocivo per gli organismi acquatici”).

## Fase 2: Caratterizzazione chimica del prodotto

Al fine di ottenere maggiori informazioni sulla composizione chimica, il prodotto "Rheosoil 143" è stato caratterizzato mediante analisi di spettrometria di massa LTQ Orbitrap XL.

L'analisi ha mostrato che nella miscela sono presenti, oltre al sodio lauriltere solfato, dei tensioattivi a corta, media e lunga catena che presentano il dodici solfato come struttura comune (**Figura 1**):

- Dodecil solfato;
- 20-[[[(dodecyloxy)sulfonyl]oxy]-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosan-1-ol (DSOH);
- Dodecil 2-idrossietil- solfato;
- Tetradecil-sulfato.



**Figura 1.** Cromatogramma LTQ-Orbitrap modalità SCAN (220.0000-800.0000 m/z) della miscela Rheosoil 143. Sono evidenziati i picchi significativi (più abbondanti) e, di lato, le formule di struttura dei composti identificati.



### Fase 3: Valutazione dell'affinità strutturale dell'additivo condizionante con gli xenobiotici presenti nella tabella 1, allegato 5 del D.Lgs. 152/2006

Per i quattro maggiori componenti della miscela (ID da 94 a 97; figg. da 2 a 5, rispettivamente) sono state valutate le similarità rispetto ai composti elencati nella tabella 1 dell'allegato V al decreto legislativo 152/2006.

Il valore di similarità è stato calcolato tramite il software "**ACD LABS 12.0**" utilizzando il coefficiente di Tanimoto (SimCoeff) (0 = non simile, 1 = corrispondenza esatta) come parametro utile alla valutazione della "affinità strutturale".

Per ciascuno dei quattro composti, la similarità chimica più alta è risultata essere comunque scarsa (dodecyl sulfate/1-tetradecyne = 0.50; tetradecyl sulfate/tetradecane = 0.51; 20-[[[(dodecyloxy)sulfonyl]oxy]-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosan-1-ol/11-Hexacosyne = 0.66; Dodecyl 2-hydroxyethyl sulfate/1-tetradecyne = 0.47), ragion per la quale, verosimilmente, anche il comportamento ambientale e tossicologico atteso sarà differente.

In particolare, i componenti della miscela presentano teste polari e ossigeni che mancano del tutto nei composti più simili, che sono apolari. Questo comporta un comportamento relativo al bioaccumulo del tutto differente, e questo va poi a modificare gli effetti tossicologici in cascata.

*Pertanto non è individuabile all'interno dei composti elencati nella tabella 1 del decreto in esame uno o più composti sufficientemente simili ai quattro maggiori componenti della miscela.*

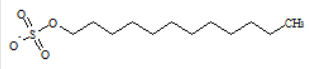
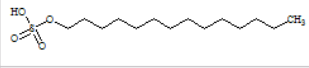


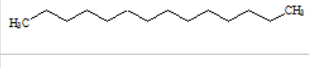
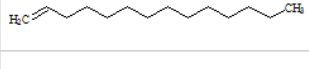
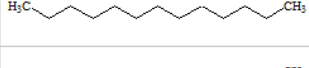

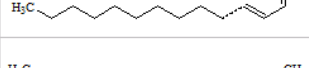




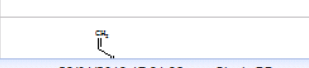
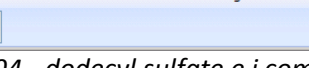



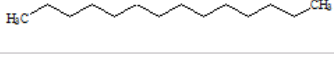
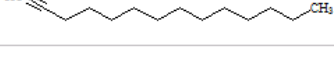



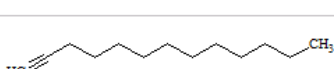

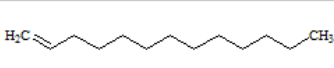
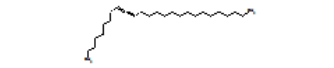
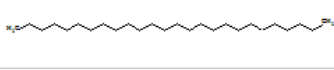
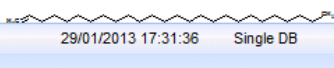
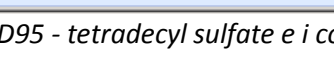
#List	#	#ID	Structure	Formula	FW	Name	SimCoeff
<input checked="" type="checkbox"/>	1	94		C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> O <sub>4</sub> S	265.3900	dodecyl sulfate	1.0000
<input type="checkbox"/>	2	95		C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub> S	294.4506	tetradecyl sulfate	0.9298
<input type="checkbox"/>	3	97		C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub> S	310.4500	Dodecyl 2-hydroxyethyl sulfate	0.8820
<input type="checkbox"/>	4	90		C <sub>14</sub> H <sub>26</sub>	194.3562	1-tetradecyne	0.4970
<input type="checkbox"/>	5	78		C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	198.3880	tetradecane	0.4970
<input type="checkbox"/>	6	82		C <sub>14</sub> H <sub>28</sub>	196.3721	1-tetradecene	0.4910
<input type="checkbox"/>	7	77		C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	184.3614	tridecane	0.4877
<input type="checkbox"/>	8	89		C <sub>13</sub> H <sub>24</sub>	180.3297	1-tridecyne	0.4877
<input type="checkbox"/>	9	86		C <sub>14</sub> H <sub>26</sub>	194.3562	1,3-tetradecadiene	0.4821
<input type="checkbox"/>	10	81		C <sub>13</sub> H <sub>26</sub>	182.3455	1-tridecene	0.4817
<input type="checkbox"/>	11	76		C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>	170.3348	dodecane	0.4780
<input type="checkbox"/>	12	88		C <sub>12</sub> H <sub>22</sub>	166.3031	1-dodecyne	0.4688
<input type="checkbox"/>	13	85		C <sub>13</sub> H <sub>24</sub>	180.3297	(3E)-1,3-tridecadiene	0.4639
<input type="checkbox"/>	14	80		C <sub>12</sub> H <sub>24</sub>	168.3190	1-dodecene	0.4630
<input type="checkbox"/>	15	84		C <sub>12</sub> H <sub>22</sub>	166.3031	1,3-dodecadiene	0.4451

Figura 2. Similarità tra ID94 - dodecyl sulfate e i composti elencati nell'allegato V del D.lgs 152/2006.

#List	#	#ID	Structure	Formula	FW	Name	SimCoeff
<input checked="" type="checkbox"/>	1	95		C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub> S	294.4506	tetradecyl sulfate	1.0000
<input type="checkbox"/>	2	94		C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> O <sub>4</sub> S	265.3900	dodecyl sulfate	0.9298
<input type="checkbox"/>	3	97		C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub> S	310.4500	Dodecyl 2-hydroxyethyl sulfate	0.9066
<input type="checkbox"/>	4	78		C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	198.3880	tetradecane	0.5146
<input type="checkbox"/>	5	90		C <sub>14</sub> H <sub>26</sub>	194.3562	1-tetradecyne	0.5058
<input type="checkbox"/>	6	82		C <sub>14</sub> H <sub>28</sub>	196.3721	1-tetradecene	0.5000
<input type="checkbox"/>	7	86		C <sub>14</sub> H <sub>26</sub>	194.3562	1,3-tetradecadiene	0.4830
<input type="checkbox"/>	8	77		C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	184.3614	tridecane	0.4795
<input type="checkbox"/>	9	91		C <sub>26</sub> H <sub>50</sub>	362.6752	11-Hexacosyne	0.4714
<input type="checkbox"/>	10	89		C <sub>13</sub> H <sub>24</sub>	180.3297	1-tridecyne	0.4709
<input type="checkbox"/>	11	96		C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> O <sub>8</sub>	494.7022	20-[[dodecyloxy]sulfonyloxy]-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosan-1-ol (DS)	0.4686
<input type="checkbox"/>	12	81		C <sub>13</sub> H <sub>26</sub>	182.3455	1-tridecene	0.4655
<input type="checkbox"/>	13	87		C <sub>26</sub> H <sub>50</sub>	362.6752	9,10-Hexacosadiene	0.4651
<input type="checkbox"/>	14	79		C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>	366.7070	HEXACOSANE	0.4626
<input type="checkbox"/>	15	83		C <sub>26</sub> H <sub>52</sub>	364.6911	1-Hexacosene	0.4562

**Figura 3.** Similarità tra ID95 - tetradecyl sulfate e i composti elencati nell'allegato V del D.lgs 152/2006.

#List	#	#ID	Structure	Formula	FW	Name	SimCoeff
<input checked="" type="checkbox"/>	1	96		C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> O <sub>8</sub>	494.7022	20-[[dodecyloxy]sulfonyloxy]-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosan-1-ol (DS)	1.0000
<input type="checkbox"/>	2	91		C <sub>26</sub> H <sub>50</sub>	362.6752	11-Hexacosyne	0.6563
<input type="checkbox"/>	3	79		C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>	366.7070	HEXACOSANE	0.6429
<input type="checkbox"/>	4	87		C <sub>26</sub> H <sub>50</sub>	362.6752	9,10-Hexacosadine	0.6364
<input type="checkbox"/>	5	83		C <sub>26</sub> H <sub>52</sub>	364.6911	1-Hexacosene	0.6332
<input type="checkbox"/>	6	93		C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390.5561	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	0.5663
<input type="checkbox"/>	7	97		C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub> S	310.4500	Dodecyl 2-hydroxyethyl sulfate	0.5149
<input type="checkbox"/>	8	95		C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub> S	294.4506	tetradecyl sulfate	0.4686
<input type="checkbox"/>	9	90		C <sub>14</sub> H <sub>26</sub>	194.3562	1-tetradecyne	0.4565
<input type="checkbox"/>	10	78		C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	198.3880	tetradecane	0.4565
<input type="checkbox"/>	11	82		C <sub>14</sub> H <sub>28</sub>	196.3721	1-tetradecene	0.4516
<input type="checkbox"/>	12	86		C <sub>14</sub> H <sub>26</sub>	194.3562	1,3-tetradecadiene	0.4439
<input type="checkbox"/>	13	94		C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> O <sub>4</sub> S	265.3900	dodecyl sulfate	0.4426
<input type="checkbox"/>	14	89		C <sub>13</sub> H <sub>24</sub>	180.3297	1-tridecyne	0.4396
<input type="checkbox"/>	15	77		C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	184.3614	tridecane	0.4396

ID: 96    A: 1/97    B: 97    29/01/2013 17:31:36    Single DB    1.0000    ACD/Labs version B

1-ChemSketch    2-History    3-Database

**Figura 4.** Similarità tra ID96 - 20-[[dodecyloxy]sulfonyloxy]-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosan-1-ol e i composti elencati nell'allegato V del D.lgs 152/2006.

#List	#	#ID	Structure	Formula	FW	Name	SimCoeff
<input checked="" type="checkbox"/>	1	97		C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub> S	310.4500	Dodecyl 2-hydroxyethyl sulfate	1.0000
<input type="checkbox"/>	2	95		C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub> S	294.4506	tetradecyl sulfate	0.9066
<input type="checkbox"/>	3	94		C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> O <sub>4</sub> S	265.3900	dodecyl sulfate	0.8820
<input type="checkbox"/>	4	96		C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> O <sub>8</sub>	494.7022	20-(((dodecyloxy) sulfonyloxy)-3,6,9,12,15,18-hexaoxaicosan-1-ol (DS)	0.5149
<input type="checkbox"/>	5	90		C <sub>14</sub> H <sub>26</sub>	194.3562	1-tetradecyne	0.4667
<input type="checkbox"/>	6	78		C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	198.3880	tetradecane	0.4667
<input type="checkbox"/>	7	82		C <sub>14</sub> H <sub>28</sub>	196.3721	1-tetradecene	0.4615
<input type="checkbox"/>	8	91		C <sub>26</sub> H <sub>50</sub>	362.6752	11-Hexacosyne	0.4537
<input type="checkbox"/>	9	86		C <sub>14</sub> H <sub>26</sub>	194.3562	1,3-tetradecadiene	0.4536
<input type="checkbox"/>	10	77		C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	184.3614	tridecane	0.4494
<input type="checkbox"/>	11	89		C <sub>13</sub> H <sub>24</sub>	180.3297	1-tridecyne	0.4494
<input type="checkbox"/>	12	87		C <sub>26</sub> H <sub>50</sub>	362.6752	9,10-Hexacosadiene	0.4480
<input type="checkbox"/>	13	79		C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>	366.7070	HEXACOSANE	0.4455
<input type="checkbox"/>	14	81		C <sub>13</sub> H <sub>26</sub>	182.3455	1-tridecene	0.4444
<input type="checkbox"/>	15	83		C <sub>26</sub> H <sub>52</sub>	364.6911	1-Hexacosene	0.4395

**Figura 5.** Similarità tra ID97 - Dodecyl 2-hydroxyethyl sulfate e i composti elencati nell'allegato V del D.lgs 152/2006.

## Fase 4: Ricerca delle proprietà chimico-fisiche e tossicologiche

Per integrare le scarse informazioni fornite dalla scheda tecnica del prodotto “Rheosoil 143”, sono state valutate le proprietà tossicologiche dei composti chimici rilevati dagli studi di spettrometria di massa. A questo proposito, sono stati condotti studi di modellistica *in silico* utilizzando i seguenti software:

- Ready biodegradability model (version 1.0.6-DEV)
- EPISuite (Ecosar model version 1.00)
- VEGA (version 1.0.6).

Questi studi si basano sul principio della correlazione tra la struttura molecolare dei composti chimici e la loro attività tossicologica. Alcuni dei modelli utilizzati forniscono, oltre ad un valore di predizione di tossicità, anche un valore ricavato sperimentalmente, basato sulla somiglianza del composto analizzato con le molecole utilizzate per costruire il modello.

Per i composti chimici Dodecil solfato, tetradecil solfato, DSOH e dodecil 2-idrossietil solfato sono state modellate le seguenti proprietà:

- Biodegradabilità;
- Tossicità acquatica (per le alghe, per i crostacei e per i pesci);
- Tossicità terrestre (per il lombrico);
- Cancerogenesi;
- Mutagenesi;
- Sensibilizzazione cutanea;
- Tossicità riproduttiva;
- Bioaccumulo.

I risultati ottenuti sono riassunti di seguito e riportati nelle **Tabelle 1 e 2**.

### Biodegradabilità

Tra i composti considerati, solo il DSOH è stato predetto come non biodegradabile.

### Tossicità acquatica

Per quanto riguarda la predizione di tossicità in ambiente acquatico, per le alghe è stato stimato che il valore della concentrazione in grado di esercitare un effetto del 50% (Effective Concentration, EC<sub>50</sub>) dopo 96 ore di esposizione è compreso tra 16 e 0.0007 mg/l, a seconda del composto considerato (**Tabella 1**). Valori di EC<sub>50</sub> compresi tra 0.02 e 3 mg/l sono stati predetti per i crostacei (*Daphnia magna*) esposti per 48 ore e risultati simili sono stati predetti per la LC<sub>50</sub> nei pesci esposti per 96 ore (**Tabella 1**). Dato che i

composti sopra citati sono stati predetti come tossici per l'ambiente acquatico, possiamo ipotizzare che anche "Rheosoil 143" possa essere potenzialmente pericoloso.

### **Tossicità terrestre**

La tossicità terrestre è stata stimata prevedendo che i lombrichi siano esposti per 14 giorni ai composti elencati in Tabella 1 e il valore della dose che risulta essere letale per il 50% degli animali (Lethal Dose<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub>) è risultato compreso tra 366 e 3700 mg/l.

### **Cancerogenesi**

La predizione è stata condotta sui composti dodecil solfato, tetradecil solfato e dodecil 2-idrossietil solfato. Il modello ha stimato che le molecole non sono potenzialmente cancerogene. Tuttavia, questa previsione potrebbe essere poco affidabile in quanto il modello dispone di pochi dati relativi a molecole con caratteristiche chimiche comparabili ai composti chimici oggetti dello studio.

### **Mutagenesi**

La predizione è stata condotta sui composti dodecil solfato, tetradecil solfato e dodecil 2-idrossietil solfato. Come riportato in Tabella 2, solo il composto dodecil 2-idrossietil solfato. è stato predetto come mutageno.

### **Sensibilizzazione cutanea**

La predizione è stata condotta sul composto dodecil solfato, tetradecil solfato e dodecil 2-idrossietil solfato. I composti sono stati predetti essere in grado di indurre sensibilizzazione cutanea e irritazione. La capacità del dodecil solfato di indurre sensibilizzazione è supportato da un dato sperimentale (Chaudhry et al., Chemistry Central Journal 2010).

### **Tossicità riproduttiva**

Il dodecil solfato e il dodecil 2-idrossietil solfato sono stati predetti dal modello come molecole che potenzialmente possono esercitare tossicità riproduttiva mentre il tetradecil solfato è stato predetto essere non tossico.

### **Bioaccumulo**

La previsione della capacità dei composti di bioaccumulare nel tessuto adiposo di *Daphnia magna* e dei pesci, è stata condotta mediante valutazione del fattore di bioconcentrazione (BCF), che definisce che un composto chimico è in grado di bioaccumularsi quando il logBCF risulta essere maggiore di 3.3.

Per tutti i composti sono stati ottenuti dei valori di logBCF inferiori a 3.3 e quindi, sono stati predetti come non in grado di bioaccumulare.

**Tabella 1.** Riassunto delle predizioni di tossicità acquatica e terrestre

Composto	Predizione di tossicità acquatica			Predizione di tossicità terrestre
	Alga verde EC <sub>50</sub> 96 ore (mg/l)	<i>Daphnia magna</i> EC <sub>50</sub> 48 ore (mg/l)	Pesce EC <sub>50</sub> 96 ore (mg/l)	Lombrico LD <sub>50</sub> 14 giorni (mg/l)
Dodecil solfato	0.007	0.43	1.66	418.785
Dodecil 2-idrossietil solfato	0.000776	0.02	0.306	592.333
DSOH	15.843	3.113	3.113	3722.780
Tetradecil solfato	0.000776	0.16	1.78	366.118



**Tabella 2.** Riassunto delle proprietà di rilevanza tossicologica predette dagli studi di modelling.

<b>Composto</b>	<b>Bioaccumulo (LogBCF)</b> (bioaccumula se > 3.3)	<b>Cancerogenesi</b>	<b>Mutagenesi</b>	<b>Sensitizzazione cutanea</b>	<b>Tossicità riproduttiva</b>
<b>Dodecil solfato</b>	2.22*	No*	No***	Si***	Si*
<b>Dodecil 2-idrossietil solfato</b>	0.83*	No*	Si*	Si*	Si*
<b>Tetradecil solfato</b>	1.94*	No*	No**	Si*	No*

La predizione fornita dal modello può essere considerata poco affidabile (\*), mediamente affidabile (\*\*) o molto affidabile (\*\*\*)

## Fase 5: Studio del potenziale rischio ecotossicologico su modelli animali e vegetali semplificati.

Lo studio del potenziale rischio ecotossicologico del prodotto “Rheosoil 143” è stato effettuato con l’ausilio dei seguenti modelli biologici:

- *Caenorhabditis elegans*, nematode invertebrato;
- *Daphnia magna*, crostaceo di acqua dolce;
- *Lepidium sativum* (crescione), *Sinapis alba* (senape) e *Sorghum saccharatum* (sorgo), piante superiori.

### 5.1 Preparazione del terreno modello

Gli studi sono stati condotti utilizzando un terreno standard OECD (formato da 85% sabbia, 10% caolino e 5% torba) la cui densità è stata stimata pari a 1237 kg/m<sup>3</sup>. Questo terreno è stato successivamente idratato con acqua contenente concentrazioni crescenti di “Rheosoil 143”. Sono stati così ottenuti terreni contenenti concentrazioni crescenti di “Rheosoil 143” (1.75 ÷ 28 ml di “Rheosoil 143” per kg di terreno).

A titolo esemplificativo, si riportano i calcoli relativi a terreno contaminato con 1.75 ml di “Rheosoil 143” per kg di terreno.

Un kilogrammo di terreno standard OECD è stato idratato con 350 ml di una acqua contenente 1.75 ml “Rheosoil 143”. Un kilogrammo di terreno OECD ha un volume di 0.00081 m<sup>3</sup> circa, per cui si ottiene una addizione di “Rheosoil 143” pari a 2.165 l/m<sup>3</sup> di terreno.

- Volume di un kg di terreno OECD:

$$\begin{aligned}\text{Volume (v)} &= \text{massa (m)}/\text{densità (d)} \\ &= 1 \text{ kg}/1237 \text{ kg/m}^3 \\ &= 0.0008084 \text{ m}^3\end{aligned}$$

- Conversione l/kg in l/m<sup>3</sup> suolo OECD

$$\begin{aligned}1.75 \text{ ml} : 0.0008084 \text{ m}^3 &= x : 1 \text{ m}^3 \\ x &= 2165 \text{ ml/m}^3 \\ &= 2.165 \text{ l/m}^3\end{aligned}$$

Se, in accordo con quanto suggerito dal committente, si considerasse la densità del terreno pari a 2000 kg/m<sup>3</sup>, ne risulterebbe che:

- Volume di un kg di terra da scavo:

$$\begin{aligned}\text{Volume (v)} &= \text{massa (m)}/\text{densità (d)} \\ &= 1 \text{ kg}/2000 \text{ kg/m}^3 \\ &= 0.0005 \text{ m}^3\end{aligned}$$

- Conversione l/kg in l/m<sup>3</sup> di suolo:

$$\begin{aligned}1.75 \text{ ml} : 0.0005 \text{ m}^3 &= x : 1 \text{ m}^3 \\ x &= 3500 \text{ ml/ m}^3 \\ &= 3.5 \text{ l/m}^3\end{aligned}$$

## 5.2 Studi su *C.elegans*

*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) è un nematode sempre più utilizzato per studi in vivo, in particolare in campo biomedico e nel campo della tossicologia ambientale (Leung MCK et al., Toxicological Sci., 2008), in quanto offre alcune caratteristiche complementari a quelle dei modelli cellulari. I vantaggi correlate all'uso di *C. elegans*, rispetto ad altri modelli animali utilizzati per questo tipo di studi (come per esempio il lombrico), comprendono: le sue ridotte dimensioni, la trasparenza del suo corpo, la velocità con cui si riproduce, la breve durata della vita, oltre che la possibilità di essere congelato in modo analogo a quanto avviene per i sistemi cellulari. Inoltre, essendo *C. elegans* un vero e proprio organismo animale, è possibile condurre studi di tipo comportamentale, di caratterizzazione biochimica dei suoi processi metabolici e studi di tracciabilità genetica. E' noto, per esempio, che alcuni pathways metabolici di *C. elegans*, come la risposta allo stress ossidativo e l'espressione di enzimi antiossidanti e/o detossificanti, sono ben conservati nell'uomo. I valori di LD<sub>50</sub> (Lethal Dose 50, la dose di composto che causa la morte del 50% degli animali trattati) ottenuti su *C. elegans* correlano con quelli ottenuti nei roditori, e questo rende lo rende un buon modello sperimentale per predire la tossicità nei mammiferi in modo complementare agli studi in vitro e in vivo (Leung MCK et al., Toxicological Sci., 2008).

Sono stati condotti degli studi sul nematode *C.elegans* per valutare *in vivo*, in un modello animale semplificato, il potenziale effetto tossico di "Rheosoil 143" diluito in acqua e del terreno modello precedentemente descritto.

Sono stati inoltre valutati gli effetti indotti dagli elutriati preparati dai vari terreni.

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti su *Caenorhabditis elegans*, utilizzando il ceppo ancestrale N2 proveniente dal *Caenorhabditis* Genetic Center (University of Minnesota, USA). I vermi sono stati coltivati su piastre di agar contenente Nematode Growth Medium (NGM) e nutriti con *E.coli* (ceppo OP50, *Caenorhabditis* Genetic Center).

### Valutazione della Tossicità di "Rheosoil 143"

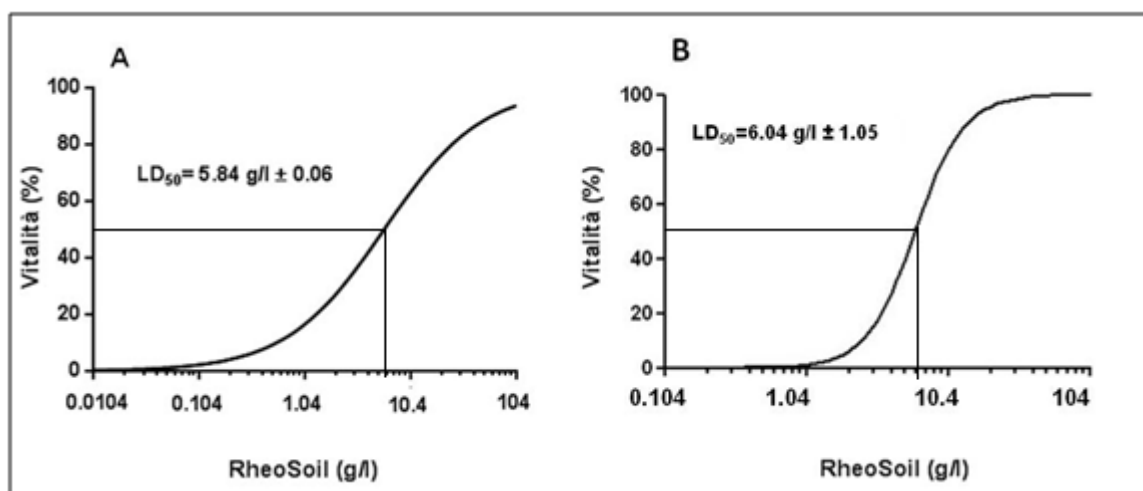
Il prodotto Rheosoil è stato diluito 1:10 (w/v) in acqua ottenendo così la soluzione 104 g/l. Tramite diluizioni seriali sono state ottenute le soluzioni 52.1 g/l, 26.05 g/l, 10.42 g/l, 5.21 g/l, 2.61 g/l, 1.04 g/l, 0.52 g/l, 0.104 g/l e 0.05 g/l.

I vermi sono stati sincronizzati come descritto da Diomedea et al. (Diomedea et al., Neurobiol. Dis., 2010) e coltivati fino al raggiungimento dello stadio larvale L4. Sono stati poi raccolti utilizzando acqua e, dopo eliminazione dei batteri mediante lavaggi eseguiti con medium salino M9, sono stati utilizzati per gli esperimenti. In particolare, i nematodi (100 vermi/100 µl) sono stati trattati con acqua (controllo) o con

le soluzioni di "Rheosoil 143" alle concentrazioni 104 g/l, 52.1 g/l, 26.05 g/l, 10.42 g/l, 5.21 g/l, 2.61 g/l, 1.04g/l, 0.52 g/l, 0.104 g/l, 0.052 g/l e 0.0104 g/l.

Dopo 2 ore di incubazione a temperatura ambiente, i vermi sono stati depositati su piastre di petri da 35mm contenenti batteri *E.coli* OP50. La vitalità dei vermi è stata determinata 3 e 24 ore dopo (Diomede et al., Neurobiol. Dis., 2010). Agli stessi tempi è stata valutata la funzionalità faringea mediante il test del pumping rate che misura il numero di contrazioni del muscolo della faringe in un minuto (pumps/minuto) (Stravalaci et al., J. Biol. Chem, 2012). Ogni esperimento è stato condotto in triplicato. Utilizzando il software Prism è stata poi effettuata l'analisi statistica dei risultati ottenuti, e calcolati i valori di LD<sub>50</sub> e della concentrazione che ha un effetto inibitorio del 50% (Inhibitory concentration<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>).

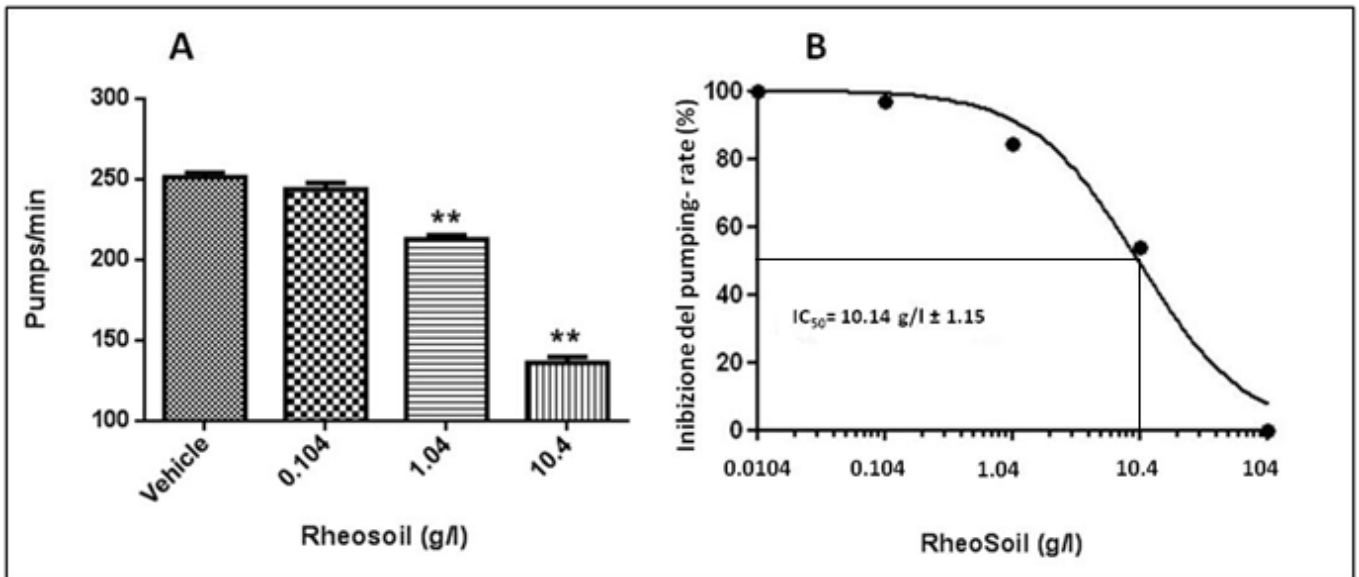
I dati ottenuti indicano che "Rheosoil 143" causa una riduzione dose-dipendente della sopravvivenza dei vermi (**Figura 6**) che si osserva sia dopo 3 che dopo 24 ore. Valori simili di LD<sub>50</sub> sono stati calcolati per i due tempi (5.84 g/l ± 0.06 e 6.04 g/l ± 1.05 g/l rispettivamente dopo 3 e 24 ore). Questi dati indicano che, dopo due ore di somministrazione, "Rheosoil 143" è in grado di indurre un effetto tossico che persiste nel tempo.



**Figura 6.** Effetto dose-risposta di "Rheosoil 143" sulla vitalità valutato 3 (A) e 24 ore (B) dopo la somministrazione.

Tre ore dopo la somministrazione, è stata inoltre valutata la capacità di "Rheosoil 143" di inibire la funzionalità faringea dei vermi. E' noto che la contrazione del muscolo della faringe rallenta, come meccanismo di difesa, quando il nematode incontra composti tossici.

Come riportato in **Figura 7**, "Rheosoil 143" è in grado di indurre una riduzione significativa della contrazione della faringe (espresso come numero di contrazioni al minuto, pumps/min) alle stesse concentrazioni che causano una riduzione della sopravvivenza. Il valore di IC<sub>50</sub> è stato calcolato pari a 10.14 g/l ± 1.15 (**Figura 7B**).



**Figura 7.** Effetto della somministrazione di Rheosoil sulla funzionalità faringea, determinata 3 ore dopo la somministrazione (\*\* $p < 0.01$  verso il controllo, one-way Anova e Bonferroni post-test).

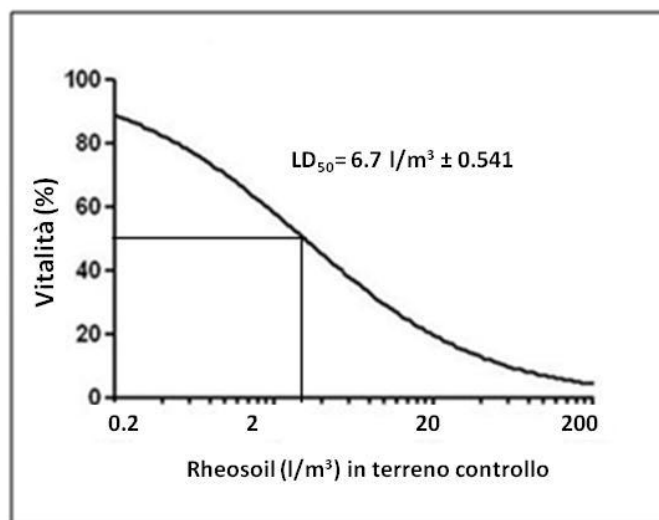
Sulla base di questi dati possiamo concludere che la dose di “Rheosoil 143” 0.104 g/l non causa una riduzione significativa della vitalità e non modifica la funzionalità faringea. Questa dose è stata quindi stabilita come la concentrazione che non ha effetti tossicologicamente rilevanti (No Effective Concentration, NOEC). Il valore di LD<sub>50</sub> risulta pari a 5.84 g/l ± 0.06.

### Valutazione della Tossicità del terreno modello addizionato con Rheosoil 143

I terreni contaminati artificialmente con quantità note di “Rheosoil 143” sono stati preparati idratando 1 g di terreno standard OECD con 1 ml di soluzione “Rheosoil 143” alle concentrazioni 1.04 g/l, 2.61 g/l, 5.21 g/l, 10.42 g/l, 26.05 g/l, 52.1 g/l e 104 g/l. I diversi preparati sono stati miscelati e lasciati ad equilibrare per 2 ore.

Per la valutazione della tossicità i vermi (50/200 µl) sono stati risospesi nel terreno standard OECD idratato con acqua (1 g/ml) e utilizzato come controllo, o nel terreno standard OECD idratato (1 g/ml) con soluzioni a concentrazioni note di “Rheosoil 143” (104.2 g/l, 52.1 g/l, 26.05 g/l, 10.42 g/l, 5.21 g/l, 2.61 g/l, 1.04 g/l, 0.52 g/l, 0.104 g/l). Dopo due ore di incubazione a temperatura ambiente, i vermi sono stati depositati su un lato di una piastra di petri da 100 mm senza batteri. All’estremo opposto della piastra sono stati depositati 100 µl di *E. coli* OP50. Dopo 24 ore dopo determinando il numero di nematodi che dal terreno è migrato verso i batteri. Allo stesso tempo è stato effettuato il test del pumping rate.

Come mostrato in **Figura 8**, “Rheosoil 143” aggiunto al terreno controllo, causa una riduzione dose-dipendente della vitalità dei nematodi. Il valore di LD<sub>50</sub> calcolato in queste condizioni è di 6.7 l/m<sup>3</sup> ± 0.541.



**Figura 8.** Effetto sulla vitalità dei nematodi del terreno controllo contaminato con concentrazioni crescenti di “Rheosoil 143”.

Sulla base dei risultati ottenuti da tutti gli esperimenti condotti su *C. elegans*, sono stati ricavati i valori a 24 ore di NOEL, di LD<sub>50</sub> e di IC<sub>50</sub> sia per la sopravvivenza che per la funzionalità faringea (**Tabella 3**).

**Tabella 3.** Valori di NOEL, di LD<sub>50</sub> e di IC<sub>50</sub> determinati dopo 24 ore di esposizione di *C.elegans* alle diverse matrici.

Matrice	Sopravvivenza				Funzionalità faringea			
	NOEC		LD <sub>50</sub>		NOEC		IC <sub>50</sub>	
	l/m <sup>3</sup>	g/l	l/m <sup>3</sup>	g/l	l/m <sup>3</sup>	g/l	l/m <sup>3</sup>	g/l
Rheosoil	-	0.104	-	6.04 ± 1.05	-	0.104	-	10.14 ± 1.15
Rheosoil nel terreno controllo	1.08	-	6.7 ± 0.541	-	1.08	-	-	-
Elutriato del terreno con Rheosoil	8.66	-	-	-	8.66	-	-	-

### 5.3 Valutazione della tossicità acquatica su *Daphnia magna*

*Daphnia magna* è un crostaceo cladocero di acqua dolce, organismo molto utilizzato per gli studi di tossicità acquatica in quanto considerato modello di consumatore primario in ecosistemi acquatici.

L'utilizzo di *Daphnia magna* è stato descritto dalla linea guida ISO 6341 dell'International Organization for Standardization (ISO) ed è riconosciuto e validato a livello internazionale. Nel panorama legislativo italiano, il test di immobilizzazione di *Daphnia magna* dopo 48 ore di esposizione ad un composto è regolato dal D.Lgs 152/2006 che prevede questo metodo come idoneo per la valutazione della tossicità secondo i "Metodi analitici per le acque IRSA-CNR, protocollo 8020".

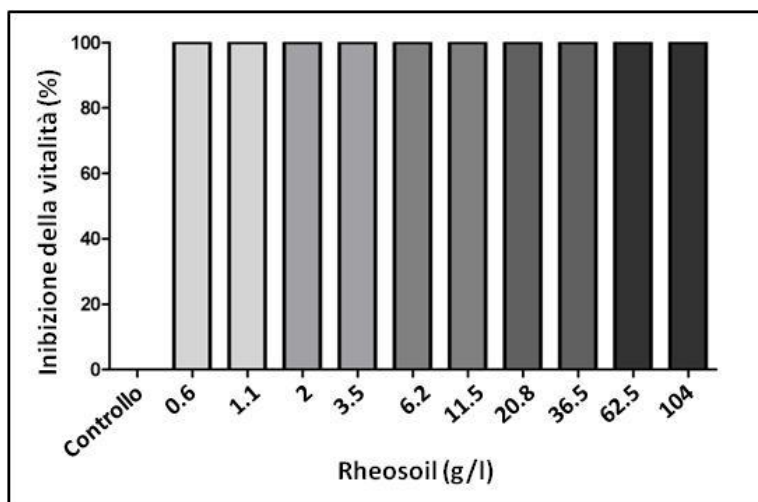
Il protocollo prevede inoltre, che l'esposizione di neonati di *Daphnia magna* ai diversi composti avvenga in condizioni controllate di luce e temperatura. Dopo 48 ore, viene valutato il numero di organismi morti o immobili e viene calcolata la concentrazione alla quale si verifica la morte o l'immobilizzazione nel 50% degli organismi (LD<sub>50</sub>). Il test prevede inoltre, che venga utilizzato un composto tossico di riferimento – il bicromato di potassio- come controllo positivo.

Utilizzando questo protocollo, sono state condotte prove di tossicità sia sul prodotto "Rheosoil 143" sia sull'elutriato ricavato dalla terra da scavo fornita dal committente.

#### Valutazione della tossicità di "Rheosoil 143"

Un prima prova è stata effettuata esponendo per 24 ore i crostacei a concentrazioni crescenti di "Rheosoil 143" diluito in acqua (0.6- 104 g/l).

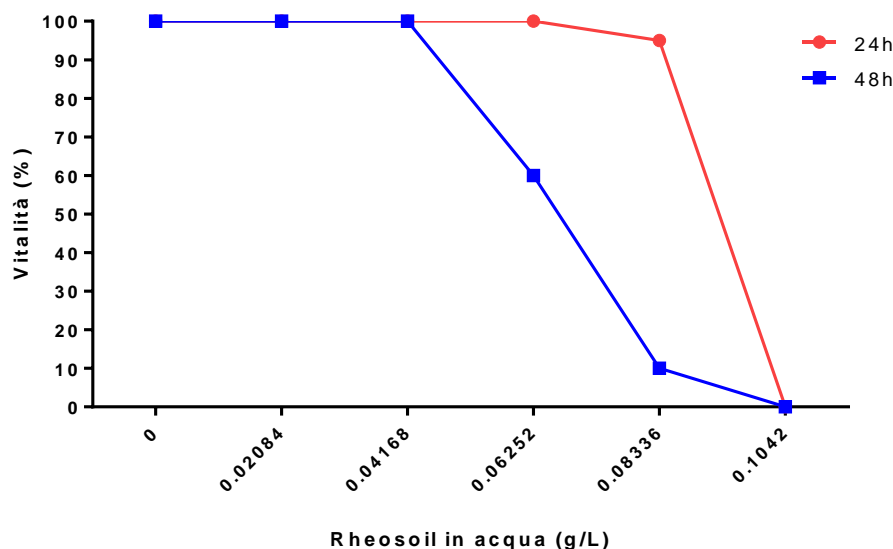
Come riportato in **Figura 9**, "Rheosoil 143", a tutte le concentrazioni, è risultato tossico in *Daphnia magna*, evidenziando che il composto potrebbe avere una marcata tossicità su questo organismo, e quindi un potenziale effetto ecotossicologico.



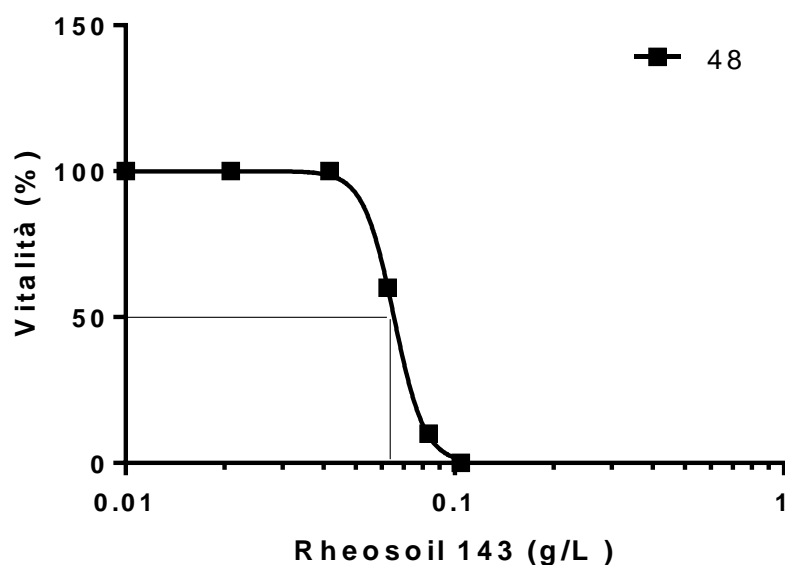
**Figura 9.** Effetti di "Rheosoil 143" su *Daphnia magna*



Gli organismi sono poi stati esposti a concentrazioni inferiori di “Rheosoil 143” rispetto alle precedenti (0.0104- 0.104 g/l) ed i risultati ottenuti, rappresentati in **Figura 10(a)**, indicano un effetto dose- risposta di “Rheosoil 143” sulla sopravvivenza di *Daphnia magna* dopo 24 ore (linea rossa) e 48 ore (linea blu).



(a)



(b)

**Figura 10.** Effetti di Rheosoil sulla vitalità di *Daphnia magna*: a) curve dose risposte b) identificazione della LC50 a 48 ore

Infine, nuovi studi sono stati condotti su *Daphnia magna* esposta per 48 ore a concentrazioni crescenti di “Rheosoil 143” (0.02- 0.10 g/l). Sono stati così determinati i valori di LD<sub>50</sub> e della NOEC a 48 ore (**Tabella 4**).

**Tabella 4.** Valori di LD<sub>50</sub> e di NOEC per 48 ore di esposizione in *Daphnia magna*.

Rheosoil (g/l)	
LD <sub>50</sub>	0.065
NOEC	0.010

## 5.4 Valutazione della tossicità terrestre mediante Fitotest

Esperimenti di Fitotossicità sono stati condotti valutando la germinazione dei semi e la crescita delle radici in piante superiori, dopo coltivazione in terreni controllo contaminati con “Rheosoil 143”.

Sono state utilizzate tre piante superiori: il sorgo (SOS, monocotiledone), il crescione (LES, dicotiledone) e la senape (SIA, dicotiledone). Il test di fitotossicità è stato effettuato seguendo un protocollo analogo a quello descritto dalla normativa ISO 11269-1 che prevede la messa a dimora di 10 semi di ciascuna pianta nei suoli campione e di controllo reidratati (in triplicato). Dopo incubazione per tre giorni, è stato valutato il numero di semi germinati, la lunghezza delle radici, del fusto e la lunghezza totale della pianta.

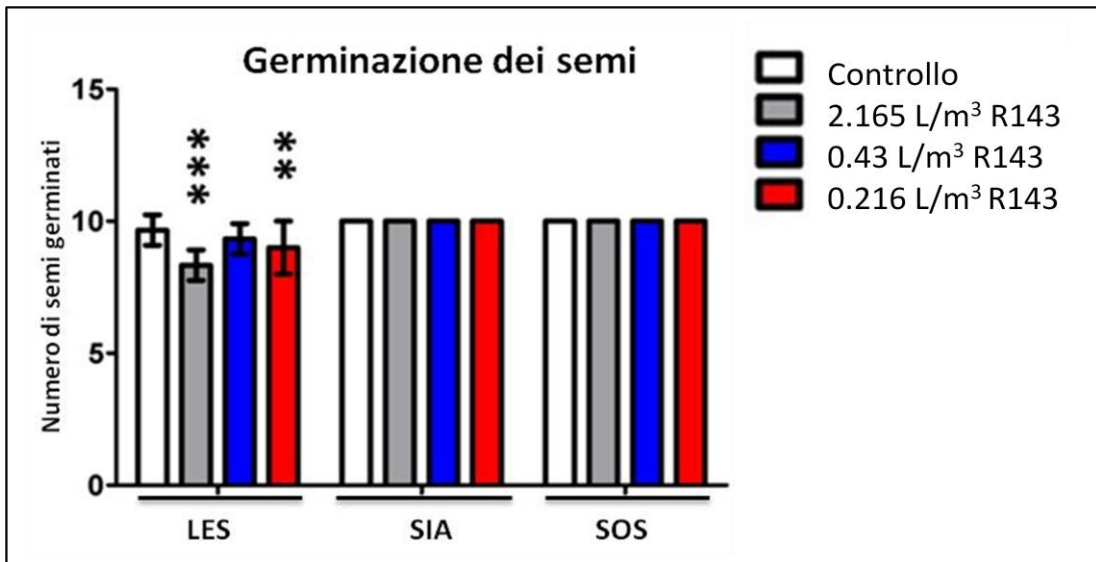
Come suolo di riferimento è stato utilizzato un suolo standard OECD.

### Valutazione della fitotossicità di “Rheosoil 143”

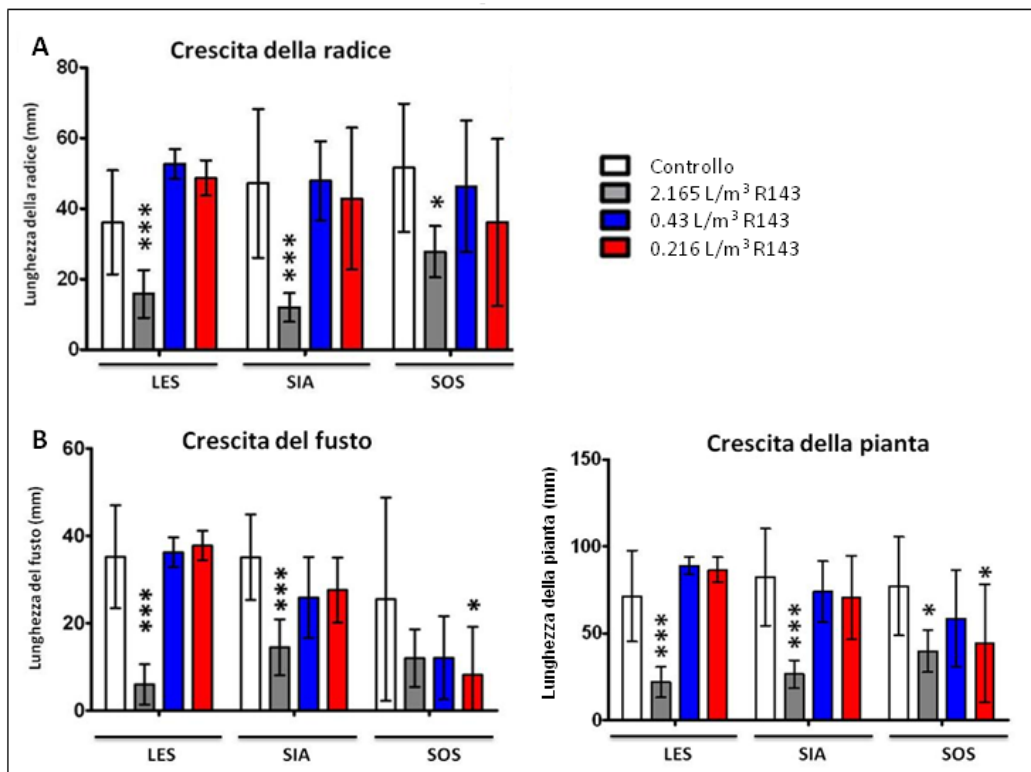
Sono state allestite due prove per valutare la tossicità di Rheosoil sulle piante superiori utilizzate nel fitotest. In una prima prova, i semi delle diverse piante sono stati messi a dimora in terreno standard OECD reidratato con “Rheosoil 143” diluito in acqua alle concentrazioni 0.21, 0.43 e 2.1 l/m<sup>3</sup>.

Come riportato in **Figura 11**, è stata osservata una lieve inibizione del tasso germinativo dei semi di crescione (LES) e di sorgo (SOS) messi a dimora nel terreno standard OECD contenente 2.165 l/m<sup>3</sup> di “Rheosoil 143”.

In queste condizioni, è stata inoltre osservata una riduzione della crescita della radice, del fusto e della lunghezza complessiva della pianta (**Figura 12**).



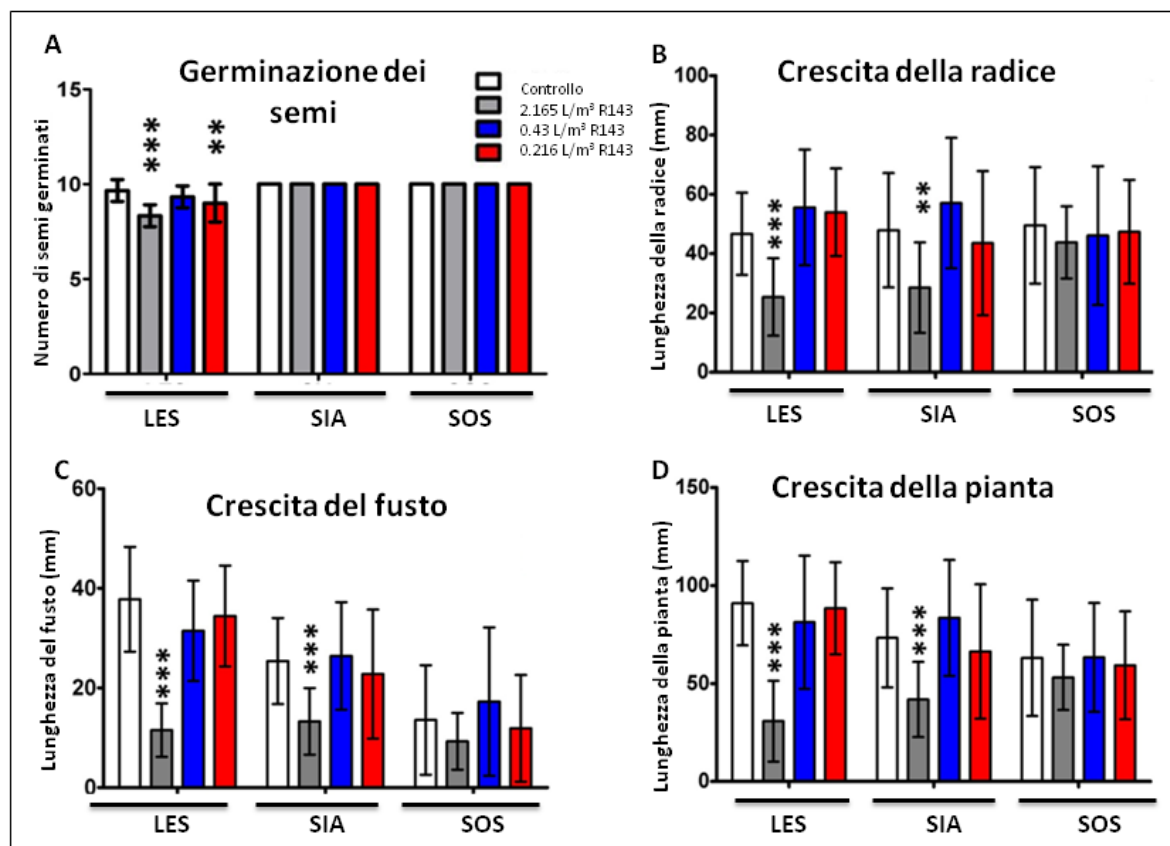
**Figura 11.** Effetto dell'aggiunta di "Rheosoil 143" al terreno standard OECD sui parametri relativi alla fitotossicità



**Figura 12.** Effetto dell'aggiunta di "Rheosoil 143" al terreno standard OECD sui parametri relativi alla fitotossicità. Sono riportati i valori medi  $\pm$  SD (\* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs il controllo, in accordo con ANOVA test e Tukey post-test).

Per verificare eventuali effetti a lungo termine, i semi delle diverse piante sono stati messi a dimora in terreno standard OECD reidratato con soluzioni acquose di "Rheosoil 143" a concentrazioni comprese tra  $0.21 \div 2.16 \text{ l/m}^3$  e i parametri correlati allo sviluppo e alla crescita delle piante sono stati valutati dopo sette giorni. Dal terzo giorno in poi, il terreno è stato idratato con acqua demineralizzata per garantire condizioni ottimali di umidità.

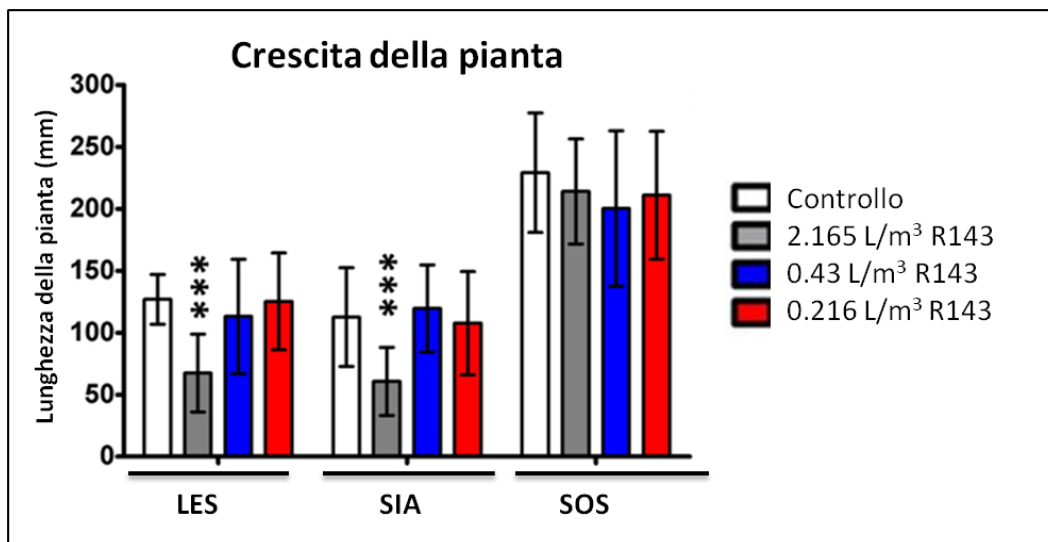
È stata osservata una lieve inibizione del tasso germinativo (**Figura 13 A**) solo dei semi di crescione (LES) messi a dimora nel terreno standard OECD contenente 2.16 l/m<sup>3</sup> di “Rheosoil 143”. A questa concentrazione è stata inoltre rilevata una riduzione della crescita delle radici, del fusto e della pianta del crescione (LES) e senape (SIA) (**Figura 13 B,C e D**).



**Figura 13.** Fitotest su terreno idratato con soluzioni di “Rheosoil 143”.

Il fatto che non si siano osservati effetti sul sorgo (SOS) potrebbe essere dovuto al fatto che le diverse piante possono avere sensibilità differenti alla tossicità indotta da agenti contaminanti.

Sulla base dei risultati ottenuti è stato stabilito che la EC<sub>50</sub> dopo tre giorni è pari a 2.165 l/m<sup>3</sup>. Allo stesso tempo, la NOEC a tre giorni per le piante considerate nello studio è risultata compresa tra 0.21 e 0.43 l/m<sup>3</sup> di “Rheosoil 143”. Valori simili di NOEC sono stati stabiliti anche per un’esposizione prolungata di sette giorni (**Figura 14**).



*Figura 14. Fitotest su terreno idratato con soluzioni di "Rheosoil 143"*

## Fase 6: Valutazione della biodegradabilità di “Rheosoil 143” e della variazione della tossicità nel tempo.

Dalla scheda tecnica risulta che il prodotto “Rheosoil 143” biodegrada in 20-30 giorni. Questo suggerisce che la tossicità correlata alla presenza di “Rheosoil 143” nella terra da scavo potrebbe diminuire con il tempo.

Per creare artificialmente in laboratorio una situazione simile a quella che si può verificare quando la terra da scavo contenente il prodotto viene stoccata all’aperto, sono stati preparati dei campioni di terreno standard OECD da un 1 kg ciascuno, idratati con una soluzione di “Rheosoil 143” in acqua a varie concentrazioni ( $1.33 \div 22 \text{ l/m}^3$ ).

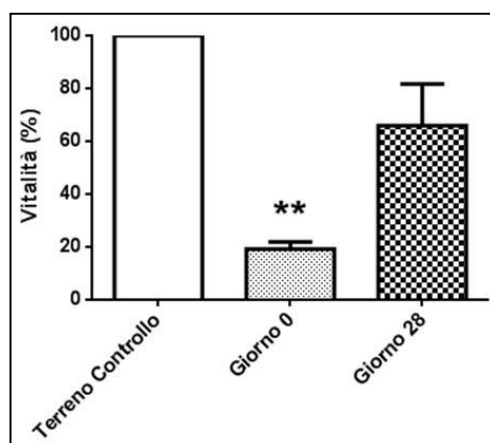
I campioni, depositati in appositi contenitori, sono stati lasciati all’aperto, esposti ai diversi agenti atmosferici ma al riparo dalla pioggia. Da ogni campione sono state prelevate prima (tempo  $\emptyset$ ) e dopo l’esposizione all’aperto (tempo 14 e 28 giorni), tre aliquote di terreno per le prove di tossicità. In particolare, sono stati effettuati studi di fitotossicità sulle piante e studi di tossicità su *C. elegans* esposti ai vari terreni inquinati. Successivamente da ciascuna aliquota sono stati ottenuti gli elutriati aggiungendo al terreno dell’acqua (1:5 e 1:10, w/v). Ciascuna sospensione è stata poi lasciata decantare per altre 24 ore e successivamente centrifugata a 2500 rpm per 15 minuti. Il surnatante è stato nuovamente centrifugato a 5000 rpm per 5 minuti ed infine raccolto ed utilizzato per la valutazione della tossicità degli elutriati in *Daphnia magna*.

## 6.1 Studi su *C.elegans*

È stata valutata la vitalità di nematodi esposti per 24 ore ad un terreno standard OECD contaminato con “Rheosoil 143” ( $35 \text{ l/m}^3$ ), e lasciato all’aperto esposto ai diversi agenti atmosferici per  $\emptyset$  e 28 giorni.

A questo proposito, i vermi ( $50/200 \mu\text{l}$ ) sono stati posti nel terreno prelevato ai giorni  $\emptyset$  e 28 o in un terreno standard OECD (terreno controllo) preventivamente idratato con acqua ( $1\text{g/ml}$ ). Dopo due ore di incubazione a temperatura ambiente, i terreni contenenti i vermi sono stati depositati su un lato di una piastra di petri da 100 mm. All’estremo opposto della piastra sono stati depositati circa  $100 \mu\text{l}$  di *E. coli* OP50. La sopravvivenza dei vermi è stata valutata dopo 24 ore, determinando il numero di nematodi presenti in prossimità dei batteri.

Come mostrato in **Figura 22**, il terreno contenente “Rheosoil 143” causa al giorno 0 una riduzione significativa della vitalità dei nematodi di circa l’80%, rispetto al terreno controllo. Dopo 28 giorni di esposizione del terreno agli agenti atmosferici non si osserva più nessun effetto significativo sulla vitalità. Questi risultati suggeriscono che “Rheosoil 143”, dopo 28 giorni, potrebbe essersi degradato e che quindi fenomeni di tossicità ad esso correlati non siano più rilevabili.



**Figura 22.** Effetto sulla vitalità dei nematodi del terreno controllo contaminato con Rheosoil ( $35 \text{ l/m}^3$ )  $**p<0.01$  verso il terreno controllo, One-way Anova e Bonferroni post-test.

È stata inoltre valutata la tossicità degli elutriati preparati dai terreni contenenti “Rheosoil 143” ed esposti per 0 e 28 giorni agli agenti atmosferici. I vermi sono stati alimentati per 2 ore con gli elutriati 1:5 e 1:10 (w/v) dei terreni contenenti  $2.16\text{-}8.66 \text{ l/m}^3$  di “Rheosoil 143”. I vermi sono stati poi depositati su una piastra di agar in presenza di batteri *E.coli* OP50 e la vitalità e sulla funzionalità faringea dei nematodi sono state valutate dopo 24 ore.

Come mostrato nella **Tabella 5**, gli elutriati non causano nessun effetto sulla sopravvivenza dei nematodi. Inoltre, nelle stesse condizioni sperimentali non è stato osservato nessun effetto sulla funzionalità faringea (dati non mostrati).

**Tabella 5. Effetto degli elutriati sulla vitalità dei nematodi.**

Rheosoil nel TERRENO	ELUTRIATO (w terreno:Vol acqua)	Vitalità dei nematodi (% del controllo)		
l/m <sup>3</sup>		Giorno 0	Giorno 14	Giorno 28
0	1:5	99.7	100	100
2.16	1:5	100	100	99.4
4.33	1:5	100	99.1	100
8.66	1:5	100	98.5	100

Rheosoil nel TERRENO	ELUTRIATO (w terreno:Vol acqua)	Vitalità dei nematodi (% del controllo)		
l/m <sup>3</sup>		Giorno 0	Giorno 14	Giorno 28
0	1:5	99.7	100	100
2.16	1:5	100	100	99.4
4.33	1:5	100	99.1	100
8.66	1:5	100	98.5	100

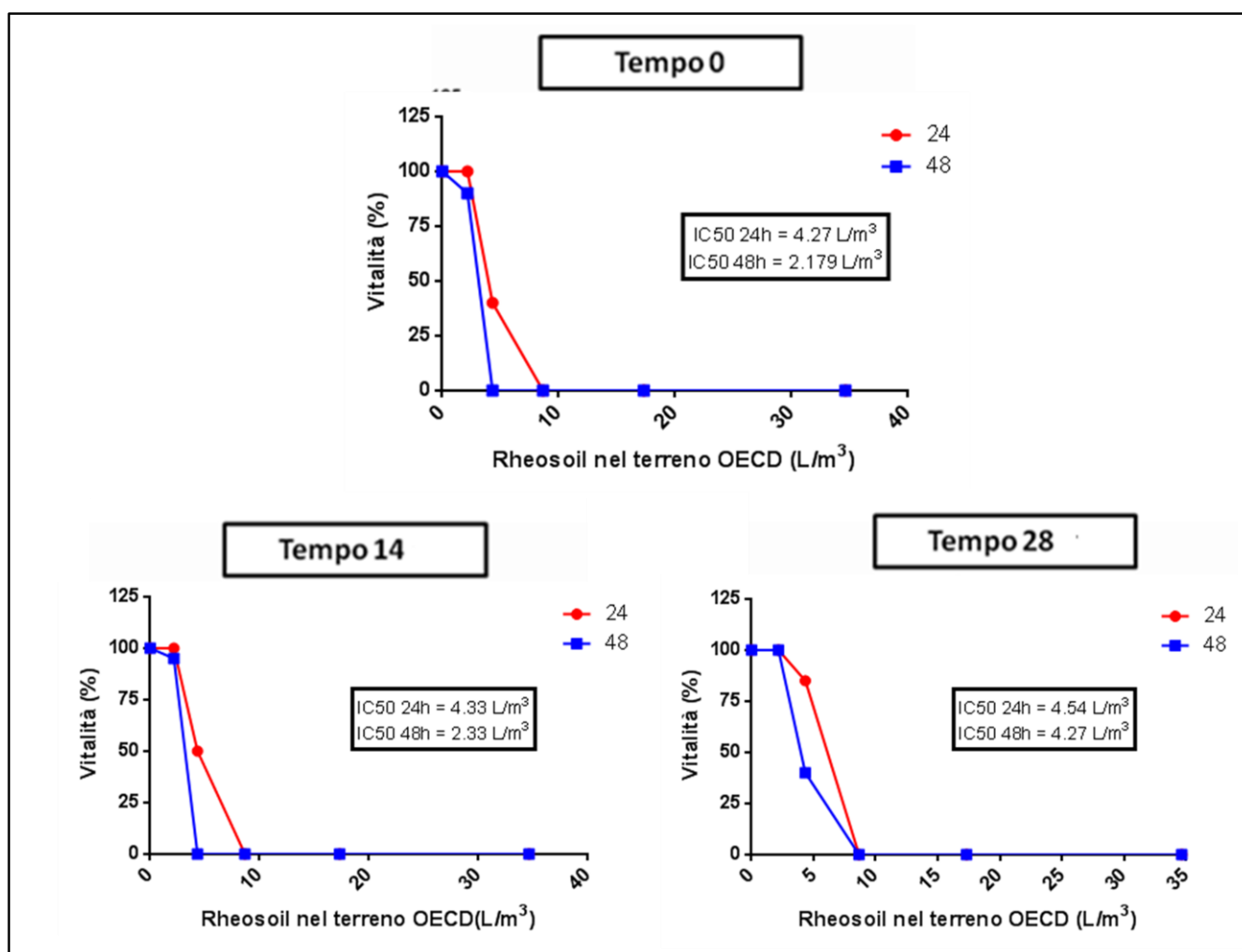
I dati ottenuti indicano che gli effetti tossici indotti in *C.elegans* da un terreno contaminato con una concentrazione molto elevata di "Rheosoil 143" (34 l/m<sup>3</sup>) non sono più presenti quando il prodotto va incontro a degradazione, come accade dopo 28 giorni di esposizione agli agenti atmosferici.



## 6.2 Risultati su *Daphnia magna*

L'effetto degli elutriati diluiti 1:5 e 1:10 (w/v) ottenuti dai terreni 0, 14 e 28 giorni dopo l'aggiunta di "Rheosoil 143" sulla vitalità di *Daphnia magna*, è stata valutata utilizzando come controllo negativo il bicromato di potassio. I risultati di tutti gli esperimenti sono da considerarsi affidabili in quanto la risposta al bicromato di potassio rientra nei valori di accettabilità previsti dalla normativa ISO 6341.

Come mostrato in **Figura 23**, l'elutriato 1:10 (w/v) del terreno al tempo 0 contenente "Rheosoil 143" in concentrazioni superiori a  $6 \text{ l/m}^3$  induce una riduzione significativa della vitalità di *Daphnia magna*, sia dopo 24 che 48 ore di esposizione. Risultati simili sono stati ottenuti con l'elutriato preparato dal terreno al tempo 14. Il valore della  $IC_{50}$  dopo 48 ore di esposizione all'elutriato del tempo 28 aumentava da  $2.3 \text{ l/m}^3$  a  $4.27 \text{ l/m}^3$ . Questi dati suggeriscono che, sebbene la scheda tecnica riporti che "Rheosoil 143" viene degradato in un mese, la sua presenza in un terreno, anche dopo 28 giorni può produrre degli elutriati con effetti tossici sull'ambiente acquatico se in concentrazioni superiori a  $2.0 \text{ l/m}^3$ .

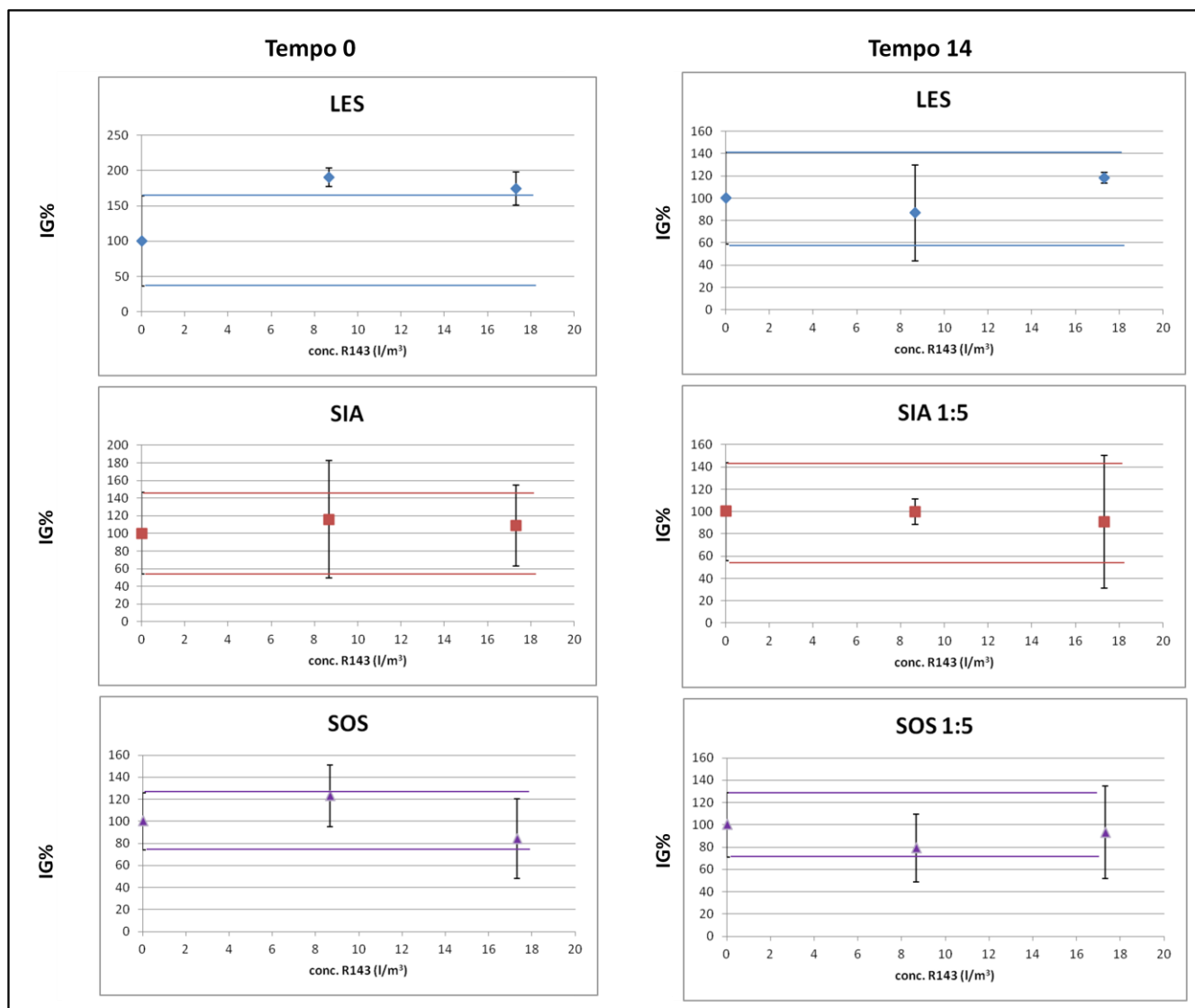


**Figura 23.** Effetto degli elutriati 1:10 sulla vitalità di *Daphnia magna*.

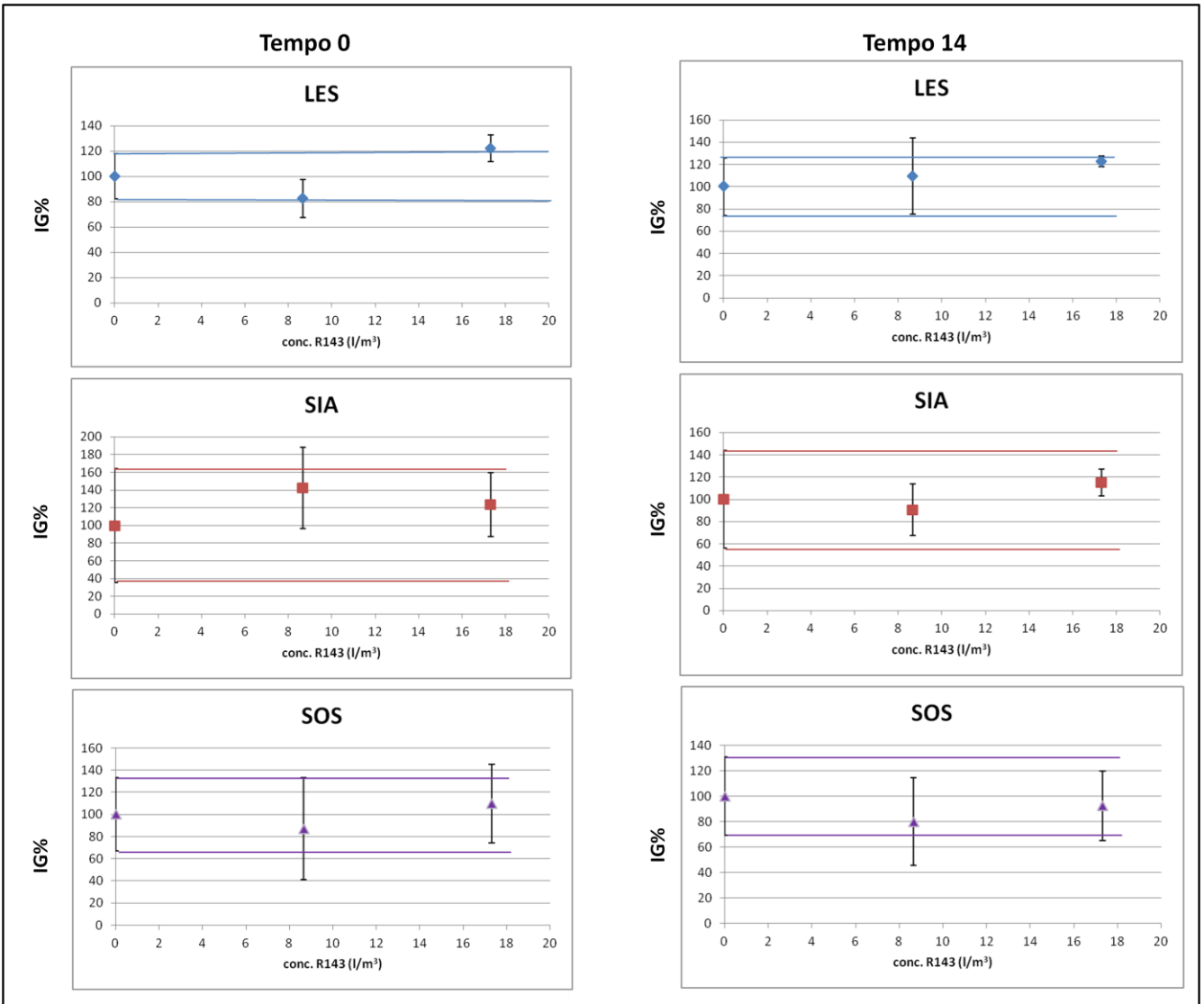
### 6.3 Valutazione della tossicità terrestre mediante Fitotest

È stato valutato l'indice di germinazione delle piante esposte elutriati 1:5 e 1:10 (w/v) ottenuti ai tempi 0 e 14 giorni dopo l'aggiunta di "Rheosoil 143" al terreno. I risultati ottenuti sono stati elaborati al fine di calcolare il valore di IG% e di costruire così delle carte di controllo.

Solo gli elutriati diluiti 1:5 (w/v) e al tempo 0, inducono un lieve effetto biostimolante sui semi del crescione (LES). In tutte le altre condizioni sperimentali non sono state osservate variazioni significative del valore di IG%, ad indicare l'assenza di un potenziale effetto fitotossico (Figure 24 e 25).



**Figura 24.** Carte di controllo ottenute per la germinazione dei semi del crescione (LES), senape (SIA) e sorgo (SOS) in presenza di elutriati diluiti 1:5 preparati da terreni 0 e 14 giorni dopo l'aggiunta di "Rheosoil 143".



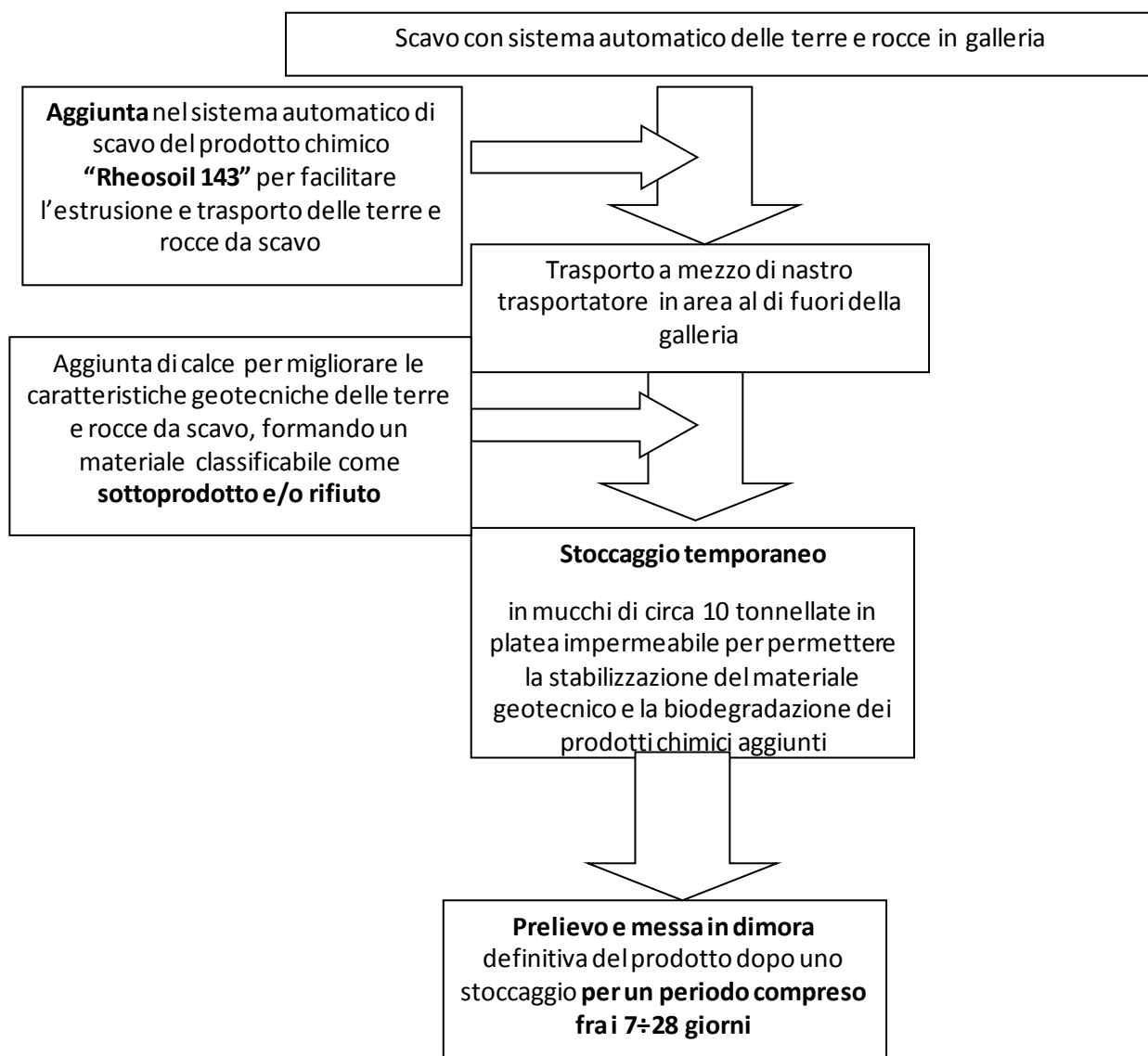
**Figura 25.** Carte di controllo ottenute per la germinazione dei semi del crescione (LES), senape (SIA) e sorgo (SOS) in presenza di elutriati diluiti 1:10 preparati da terreni 0 e 14 giorni dopo l'aggiunta di "Rheosoil 143".

## Sintesi e Conclusioni

In sintesi, il presente lavoro scientifico nasce con l'intento di valutare quale possa essere il grado di contaminazione delle terre e rocce da scavo da prodotti chimici (in questo caso "Rheosol 143") senza creare potenziali danni all'ecosistema recettore.

Si specifica che per "ecosistema recettore" si intende in primo luogo il sito di messa in dimora delle terre e rocce da scavo, conseguentemente e sequenzialmente l'habitat circostante, ovvero i suoli e sistemi acquiferi superficiali e/o sotterranei.

Per i bioassays svolti in laboratorio, abbiamo analizzato il ciclo produttivo come risulta dallo schema seguente:



Dopo prove preliminari sul prodotto chimico tal quale, abbiamo modellato il ciclo produttivo in laboratorio utilizzando una terra standard OECD priva di contaminazione da altre sostanze estranee all'esperimento in essere.

Una serie di campioni di terreno OECD è stata addizionata con quantità crescenti di prodotto chimico Rheosoil 143 ed esposta alle naturali condizioni atmosferiche per 28 giorni. Durante questo intervallo sono state prelevate aliquote di campione al tempo T $\emptyset$ , T14 e T28 giorni.

Le aliquote di campione prelevato risultano essere il modello del materiale T.Q. messo a dimora, mentre analoghe aliquote sono state trattate con acqua nei rapporti 1:5 ed 1:10 formando un elutriato che risulta essere il modello dell'estrazione per dilavamento (precipitazioni) del contaminante dal materiale messo a dimora e assumendo poi che questo flusso acquoso possa migrare verso i recettori ambientali circostanti, siano essi suoli o acque, contaminandoli.

Per valutare il danno ecologico potenziale sono stati scelti come target modelli animali e vegetali, precisamente per il suolo un nematode e tre piante superiori, e per le acque un crostaceo d'acqua dolce.

I tre modelli sono stati esposti al terreno contaminato o agli elutriati derivati dai materiali contaminati a diversi tempi di stoccaggio/esposizione.

Le risultanze analitiche delle prove sperimentali effettuate hanno permesso di stabilire le concentrazioni alle quali si osservano effetti dannosi nel 50% degli organismi esposti al trattamento (LD50 effetti letali, IC50 effetti inibitori) e le concentrazioni alle quali non si osserva nessun alcun effetto dannoso (NOEC) .

In conclusione, i bioassays effettuati presso i nostri laboratori hanno mostrato una marcata diminuzione del danno negli organismi modello all'aumentare del tempo di stoccaggio/esposizione del terreno utilizzato come modello della terra da scavo, confermando la biodegradabilità del prodotto.

#### **Indicazione per il controllo del condizionamento del terreno durante i lavori**

Qualora l'additivo condizionante utilizzato fosse il Rheosoil 143, sulla base delle ricerche sperimentali effettuate possiamo suggerire di immettere nella camera di spinta durante l'avanzamento della fresa una quantità massima di  $2.16 \pm 0.16$  litri di Rheosoil 143 per metro cubo di terreno OECD equivalente a  $3.5 \pm 0.3$  litri per metro cubo di roccia scavata utilizzando la densità tipica indicata dal committente ( $2000\text{kg/m}^3$ ).

Si consiglia inoltre di attendere almeno 14 giorni in sede di stoccaggio provvisorio, prima di porre a dimora definitiva, in modo che il processo di decadimento degli elementi biodegradabili contenuti nell'additivo possa essere ad uno stadio avanzato. Lo studio ha dimostrato infatti che, dopo 14 giorni di stoccaggio all'aria e agli agenti atmosferici, la tossicità del prodotto nelle condizioni ipotizzate dal nostro modello risulta diminuita sebbene il prodotto non sia completamente biodegradato.

Se l'additivo utilizzato fosse diverso da quello analizzato nello studio, consigliamo di effettuare indagini ecotossicologiche analoghe a quelle descritte in questo rapporto PREVENTIVAMENTE alle operazioni di scavo. Tali studi permetteranno infatti di stabilire le condizioni operative (volume da immettere nella camera di spinta per metro cubo di materiale scavato) e il tempo di stoccaggio.

Nel dettaglio queste sono le analisi da effettuare sull'additivo prescelto (se diverso da Rheosoil 143):

- Valutazione della similarità con i composti elencati in tabella 1 dell'allegato 5 alla parte IV del D.Lgs 152/2006;
- Test acuto di immobilizzazione di *Daphnia magna* sull'elutriato derivato da terreni OECD inquinati a diverse concentrazioni di additivo ;
- Test di vitalità e funzionalità faringea su *C. elegans* esposto a terreni OECD inquinati a diverse concentrazioni di additivo e ai suoi elutriati.

Stabilito il quantitativo massimo di additivo condizionante utilizzabile per metro cubo di materiale scavato, sarà necessario richiedere all'impresa la registrazione dei quantitativi effettivamente utilizzati relativamente alla porzione di scavo in essere. Si suggerisce inoltre di aggiungere alle analisi chimico-fisiche attualmente prescritte dalla normativa sul materiale scavato, almeno i test su *C. elegans* e *D. magna*, qualora il recettore ambientale potenzialmente esposto sia rispettivamente solo terreno (suolo) o acqua di bacino idrologico.

Si ritiene utile e/o necessario effettuare le prove ecotossicologiche su campioni di terra da scavo prima della posa nel luogo di destinazione finale.

Questo permetterebbe di avere la ragionevole garanzia che gli scarti di produzione delle terre e rocce da scavo possano essere riutilizzate nel medesimo o altro processo produttivo senza arrecare danno all'ambiente e possano quindi essere considerati sottoprodotti e non rifiuti.