

RAPPORTO DI PROVA Nr.: R202105970 del: 09-apr-21 Rev. 0

Richiedente:	NEXTECO s.r.l. Via DEI QUARTIERI, 45 - CAP 36016 - THIENE - VI	ID richied: C17063
Committente:	NEXTECO s.r.l. Via DEI QUARTIERI, 45 - CAP 36016 - THIENE - VI	ID cliente: C17063

Campione di:	RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 1	N° lotto/partita: --
Punto di prel.:	--	
Proveniente da:	C/O CANTIERE BBT, SOTTO ATTRAVERSAMENTO ISARCO FORTEZZA (BZ)	
Nr. Accettazione (ID MAC):	M2101258	ID campione: 202104554 Data ricev.: 17-mar-21 Ora ricev.: 17:40
Descrizione:	--	
Categoria Merceologica:	PRODOTTI SOLIDI IN GENERE	

Verbale campionamento Nr. (MAC Est):	31841	Data Camp.: 17-mar-21	Ora camp.: 14:20
Metodo di campionamento: (1)	UNI 10802:2013		
Resp campionamento:	Ns. Tecnico	Milani p.i. Matteo	
Note sul campionamento:	La massa del campione di laboratorio è di circa 2 kg. Preparazione del campione ed applicazione del piano di campionamento in accordo alla norma UNI EN 14899:2006 Campione formato da n° 3 aliquote denominate A,B,C.		
Condizioni Ambientali:	Sereno		
Informazioni dichiarate dal committente:	Rifiuto QUICK JET SET Codice CER: 170101		

RISULTATI DI PROVA

Parametri Metodo di Prova	Unità Mis.	Valori riscontrati	Limiti	LOQ	Data Inizio Data Fine	Note
TEST ECOTOSSICOLOGICI	--	--	--	--		
Test di tossicità acuta con Zebrafish (conc. limite - determinazione CL50)	mg/L	>100	--	--	02/04/2021	
OECD/OCDE 203 (2019)					06/04/2021	
Test di tossicità acuta con Daphnia magna Straus (conc. limite - determinazione CE50)	mg/L	>100	--	--	22/03/2021	
OECD/OCDE 202 (2004)					24/03/2021	
Test di tossicità con Pseudokirchneriella subcapitata (conc. limite - determinazione CrE50 e NOEC)	mg/L CrE50 mg/L NOEC	>100 >100	--	--	26/03/2021	
OECD/OCDE 201 (2011)					29/03/2021	
Test di tossicità cronico con Daphnia magna (conc. limite NOEC)	mg/L	>1	--	--	19/03/2021	
OECD/OCDE 211 (2012)					09/04/2021	
Determinazione di effetti ecotossici su piante superiori (conc. Limite) - CE50	mg/kg	>1000	--	--	19/03/2021	
OECD 208 (2006)					06/04/2021	

LOQ = Limite di Quantificazione del metodo di prova utilizzato.

s.s. = sostanza secca tq o non specificato = come campionato

§ = Le prove contrassegnate da questo simbolo sono state eseguite in subappalto da laboratorio esterno.

F=Valore riscontrato superiore alla normativa di riferimento se indicata (Limiti).

L'intervallo di confidenza e/o l'incertezza di misura non sono stati considerati ai fini della valutazione della conformità ai requisiti e/o specifiche.

Nel caso di ricerche multianalita, le somme riportano la sommatoria dei parametri ricercati indicati nel presente rapporto di prova. Qualora i singoli analiti risultino tutti inferiori ai rispettivi LOQ, la somma sarà posta inferiore al limite di quantificazione più alto.

() Nei campioni di emissione in atmosfera, i valori riportati tra parentesi, se presenti, esprimono le concentrazioni degli inquinanti in flusso di massa. Per valori riscontrati elevati (ad es. microbiologici) i valori vengono espressi in forma esponenziale secondo il Sistema metrico Internazionale: ad es. $10E+06 = 10000000$, $54E+05 = 5400000$, dove E indica il numero di zeri da aggiungere alla cifra iniziale, questo per rendere più leggibile il rapporto di prova.

() Nei campioni di emissione in atmosfera, i valori riportati tra parentesi, se presenti, esprimono le concentrazioni degli inquinanti in flusso di massa. Per valori riscontrati elevati (ad es. microbiologici) i valori vengono espressi in forma esponenziale secondo il Sistema metrico Internazionale: ad es. $10E+06 = 10000000$, $54E+05 = 5400000$, dove E indica il numero di zeri da aggiungere alla cifra iniziale, questo per rendere più leggibile il rapporto di prova.

Note ai risultati di prova:

- Per la prova eseguita secondo il metodo "OECD/OCDE 203 (1992) Test di tossicità acuta con Zebrafish (conc. limite - determinazione CL50)" vedasi Relazione Tecnica RT210275**
- Per la prova eseguita secondo il metodo "OECD/OCDE 202 (2004) Test di tossicità acuta con Daphnia magna Straus (conc. limite - determinazione CE50)" vedasi Relazione Tecnica RT210276**
- Per la prova eseguita secondo il metodo "OECD/OCDE 201 (2011) Test di tossicità con Pseudokirchneriella subcapitata (conc. limite - determinazione CrE50 e NOEC)" vedasi Relazione Tecnica RT210277**
- Per la prova eseguita secondo il metodo "OECD/OCDE 211 (2012) Test di tossicità cronico con Daphnia magna (conc. limite NOEC)" vedasi Relazione Tecnica RT210278**
- Per la prova eseguita secondo il metodo "OECD 208 (2006) Determinazione di effetti ecotossici su piante superiori (conc. Limite) - CE50" vedasi Relazione Tecnica RT210279**

Stato delle revisioni del rapporto di prova

Revisione	Data Rev.	Motivo Revisione
0	09-apr-21	prima emissione

Documento firmato digitalmente con firma autorizzata dall'ordine professionale ai sensi del Regolamento UE n. 910/2014 del 23/07/2014 e smi.

Direttore Tecnico

PASI Dott.ssa Chim.MANUELA

n°734 Ordine Int. Chimici Veneto

Per DATA INIZIO si intende la data di presa in carico del campione, per DATA FINE si intende la data di avvenuta verifica del dato analitico. I dati riportati nel presente Rapporto di Prova sono riferiti esclusivamente al campione sottoposto alle prove. La riproduzione parziale del presente Rapporto di Prova deve essere autorizzata per iscritto dal laboratorio. Un controcampione, se non deperibile o esaurito nel corso delle prove, è conservato presso il laboratorio per 30 giorni dalla data di emissione del rapporto di prova, salvo diversi accordi contrattuali. I dati grezzi ed i tracciati strumentali sono archiviati per 10 anni. (1) In assenza di indicazioni si intende che il campione è stato provato come pervenuto in laboratorio ed i dati di prelievo, la tipologia del campione e la provenienza del campione è stata indicata dal committente.

Azienda con Sistema di Gestione per la Qualità certificato UNI EN ISO 9001:2015 - Certificato CSQA n.131 - Registrazione IQ-Net n.IT-4818
Laboratorio inserito nell'elenco dei Laboratori accreditati dalla Regione Veneto ai sensi dell'art.54, comma 2 della L.R. n.33/1985
Laboratorio iscritto nel Registro Regionale del Veneto n.19 dei Laboratori non annessi alle industrie alimentari ai fini dell'autocontrollo ai sensi dell'accordo Stato - Regioni Rep. Atti n.78/CSR del 8 luglio 2010.
Laboratorio iscritto all'Albo dei Laboratori di Ricerca con Decreto Dirigenziale n.1417/Ric. Del 28 giugno 2005.
Laboratorio inserito con il DM 10 aprile 2009 nell'elenco dei laboratori competenti a prestare i servizi necessari per verificare la conformità dei fertilizzanti ed ammendanti ai sensi del Decreto Legislativo n. 75/2010.



STUDIO DI TOSSICITÀ ACUTA IN AMBIENTE ACQUATICO CON *BRACHYDANIO RERIO* - ZEBRAFISH (Concentrazione limite)

Campione in prova:

RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 1 (ID campione: 202104554)

Relazione Tecnica n.:

RT 210275 rev. 00
del 08/04/2021

Committente:

NEXTECO s.r.l.
Via Dei Quartieri, n. 45
36016 Thiene (VI)

STATO DELLE REVISIONI DEL DOCUMENTO

REV.	DATA	OGGETTO DELLA REVISIONE
00	08/04/2021	EMISSIONE DOCUMENTO

PROCEDIMENTO DI APPROVAZIONE

ESECUTORE PROVE		REDATTO		APPROVATO	
FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA
RESPONSABILE REPARTO ECOTOSSICOLOGIA	Tagliati Chiara	Vice DIRETTORE TECNICO	Zecchini Fulvio	DIRETTORE TECNICO	Pasi Manuela

SOMMARIO

1. Riassunto	3
2. Obiettivo dello studio.....	3
3. Campione oggetto dello studio	3
4. Sperimentazione.....	3
4.1 Metodo di prova	3
4.2 Apparecchiatura utilizzata	3
4.3 Reagenti.....	4
4.4 Preparazione del campione	4
4.5 Altri dettagli della prova.....	4
5. Dati grezzi	6
6. Calcoli	8
6.1 Criteri di validità.....	8
7. Risultati e conclusioni	8
8. Archivi	8
9. Bibliografia.....	8

Autorizzazione utilizzo *Brachydanio rerio* a fini scientifici

Lab-Control è autorizzato Ministero della Salute, ai sensi del D.Lgs. 26/2014 “Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici”, quale stabilimento utilizzatore di *Brachydanio rerio* e altre specie ittiche a fini scientifici (autorizzazione n. 1/2015-UT del 29/01/2015).

Ogni stabilimento utilizzatore deve presentare un progetto di ricerca ex art. 31 del D.Lgs. 26/2014 per poter utilizzare vertebrati in laboratorio. In data 15/01/2021, il Ministero, con autorizzazione n. 40/2021-PR, ha approvato il nuovo progetto di Lab-Control (prot. C4BC0.0) “Test di tossicità acuta su pesci con metodo OECD 203:2019 e Reg. EU 440/2008 Allegato Parte C, metodo C.1, per l’attribuzione della caratteristica di pericolosità HP 14 (ecotossico) a sostanze/miscele chimiche e rifiuti”, come progetto di tipo regolatorio, soggetto ad approvazione di Fase A (generale) e di Fase B (specifica per ogni campione da testare). Prima di procedere alla prova con *B. rerio*, si deve inviare al Ministero una scheda descrittiva di Fase B per ogni campione da analizzare, attraverso il portale stabulari. Per l’autorizzazione di ogni scheda devono essere corrisposti i diritti di cui al D.M. 27/03/2019, Tariffa F – ex art. 31 e 33, D.Lgs. 26/2014. L’approvazione avviene entro 5 giorni lavorativi, trascorsi i quali il portale indica che si può procedere alla prova (silenzio/assenso).

1. Riassunto

La presente relazione tecnica riassume in modo completo tutti i dati raccolti nel corso dello studio, le condizioni di esposizione dei pesci alla concentrazione limite del campione e i risultati calcolati.

I pesci, di lunghezza totale raccomandata di 1-2 cm, sono esposti al campione di prova, aggiunto all'acqua, per un periodo di 96 ore. La mortalità viene registrata a 24, 48, 72 e 96 ore e confrontata con i valori ottenuti dal controllo.

2. Obiettivo dello studio

Lo scopo del presente test è stato quello di determinare l'effetto della concentrazione limite del campione di prova in ambiente acquatico, sul pesce d'acqua dolce *Brachydanio rerio*, per valutare se questo campione possa presentare effetti di tossicità acuta.

3. Campione oggetto dello studio

In data 17/03/2021, Lab-Control ha provveduto a prelevare presso il punto indicato dal committente il campione, denominato RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 1, e a trasportarlo in giornata al proprio laboratorio di prova, dove è stato identificato con l'ID 202104554.

Il campione, una volta ricevuto, è stato conservato sigillato, a temperatura refrigerata e al riparo dalla luce solare prima dell'esecuzione delle prove e verrà conservato nell'archivio campioni in tali condizioni per un mese dopo la fine dello studio.

4. Sperimentazione

4.1 Metodo di prova

Il seguente studio fa riferimento al metodo OECD/OCDE 203:2019 – OECD guideline for testing of chemicals - Fish, Acute Toxicity Test, integrato con le indicazioni del Regolamento CE 440/2008 - Allegato Parte C, C.1. Tossicità acuta per pesci.

4.2 Apparecchiatura utilizzata

- Acquari per la stabulazione dei pesci, dotati di pompa di calore, sistema filtrante e sistema di illuminazione.
- Recipienti aventi un volume di 5 L, in plastica trasparente per evitare processi di adsorbimento o di rilascio di sostanze che possono interferire con il saggio.
- Lampade fluorescenti che diano una illuminazione attenuata di circa 1500-2000 lux.
- Temporizzatore per il controllo del fotoperiodo.
- Termometri capaci di registrare la temperatura massima e minima.
- Pompe per acquari.
- Ossimetro per la misurazione dell'ossigeno disciolto.
- pH-metro.
- Equipaggiamento di laboratorio per la determinazione della durezza.
- Normale vetreria di laboratorio.

4.3 Reagenti

ORGANISMO TEST

Il *Brachydanio rerio* (Zebrafish) è la specie sperimentale utilizzata. Il fornitore è il Model Organism Facility Department of Cellular, Computational and Integrative Biology – CIBIO, University of Trento (fornitore autorizzato ai sensi dell'art. 20 del D.Lgs. 26/2014). I pesci utilizzati per il saggio erano in buona salute e non presentavano evidenti malformazioni, come dichiarato nel certificato rilasciato dal fornitore. I pesci provenivano da un singolo gruppo con lunghezza (1-2 cm) ed età simili. Sono stati mantenuti per 9 giorni (2 di assestamento e poi 7 di acclimatazione) nelle seguenti condizioni:

- densità degli animali: un carico di biomassa di 0,8 g/L;
- acqua: vedi paragrafo successivo;
- concentrazione dell'ossigeno disciolto: vedi paragrafo successivo;
- illuminazione: fotoperiodo da 12 a 16 ore al giorno;
- alimentazione: tre volte alla settimana o quotidianamente con sospensione 24 ore prima dell'inizio della prova.

ACQUA DI ALLEVAMENTO E DI DILUIZIONE

Per l'allevamento e le diluizioni è stata utilizzata acqua potabile, decantata per 24 ore al fine di eliminare il cloro residuo, non contaminata da concentrazioni potenzialmente pericolose di metalli pesanti o altri inquinanti. Tale acqua aveva le seguenti caratteristiche specificate da metodo:

- concentrazione $O_2 > 5,14$ mg/L a 23°C e 1 atm
- salinità = 0,16‰* (calcolata dalla conducibilità; deve essere $< 0,2$ ‰)
- pH = 7,7* (deve essere 6,0-8,5)
- durezza = 140 mg $CaCO_3/L$ * (deve essere 40-250 mg $CaCO_3/L$, preferibilmente < 180 mg $CaCO_3/L$)

*fonte dati: Acquevenete 2021 (www.acquevenete.it)

4.4 Preparazione del campione

Le concentrazioni testate sono state ottenute partendo da una soluzione madre con rapporto solido/liquido 1:10 S/L, preparata mediante lisciviazione del campione a granulometria = 4 mm con acqua di allevamento secondo la norma UNI EN 14735:2005 (EC-1-2008) "Caratterizzazione di rifiuti - Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche". La soluzione è stata messa poi ad agitare con miscelatore a rovesciamento a 10 rpm per 24 h a 23°C. L'estratto acquoso è stato lasciato sedimentare per 15 minuti. Infine, è stato filtrato su membrana 0,45 µm prima di allestire la prova.

Il controllo negativo è composto dalla sola acqua di allevamento.

4.5 Altri dettagli della prova

Gruppi test e controlli

I contenitori di prova sono stati riempiti con 3 L di acqua di diluizione e soluzione del campione di prova (solo acqua di diluizione per il controllo).

Come indicato al § 30 "Test limite" del metodo di prova OECD/OCDE 203:2019, al fine di ridurre il numero di esemplari utilizzati, può essere eseguita una prova preliminare con un solo contenitore con 7 pesci sia per il test che per il controllo. Se con 7-10 pesci per contenitore si registra al massimo un decesso, secondo la teoria

binomiale (equazione di Bernoulli con $p=q=50\%$) c'è almeno il 94-99% di probabilità che la CL_{50} sia maggiore della concentrazione limite testata.

Concentrazione del test

È stata utilizzata una concentrazione limite di prova pari a 100 mg/L.

Condizioni di esposizione

La prova è stata effettuata in modalità statica.

La temperatura è rimasta compresa nell'intervallo $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ed è stato applicato un ciclo di 16 ore di luce e 8 ore di buio, con intensità di 540-1000 lumen.

La densità degli individui in prova è di circa 0,8 g/L (peso umido).

La concentrazione di ossigeno $\geq 60\%$ (ovvero 5,14 mg/L a 23°C e 1 atm) del valore di saturazione in aria (8,56 mg/L a 23°C e 1 atm, fonte: FAO, 1987, ARAC/87/WP/12(9)).

I recipienti di prova non sono stati aerati durante il test, che è stato effettuato senza regolazione del pH.

I pesci non sono stati alimentati durante la prova.

Durata

La durata del test è stata di 96 ore, escluse le fasi di preparazione.

5. Dati grezzi

1° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 01/04/2021

Nel primo giorno dello studio è stato preparato l'estratto acquoso del campione come sopra descritto.

2° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 02/04/2021

L'eluato è stato filtrato su filtri rapidi e poi su filtri con porosità 0,45 µm. Quindi sono state realizzate le diluizioni necessarie. Per la concentrazione testata e per il controllo sono stati misurati giornalmente i valori di pH e di ossigeno disciolto (Tab. 1).

Tab. 1: valori di pH e ossigeno disciolto per la concentrazione testata e per il controllo all'inizio del test

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,62	8,14
100 mg/L	8,75	8,14

I pesci sono stati esaminati dopo le prime 2-4 ore e non si sono osservate mortalità o anomalie.

3° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 03/04/2021

Dopo 24 ore di esposizione sono stati controllati gli organismi all'interno dei contenitori per contare gli eventuali morti (Tab. 2).

Tab. 2: numero di organismi morti per contenitore dopo 24 ore.

Concentrazione	Decessi
Controllo	0/7
100 mg/L	1/7

Tab. 3: valori di pH e ossigeno disciolto per la concentrazione testata e per il controllo dopo 24 ore di esposizione

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,60	8,29
100 mg/L	8,70	8,32

Dopodiché tutti i contenitori sono stati rimessi alle stesse condizioni per altre 24 ore di esposizione.

4° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 04/04/2021

Dopo altre 24 ore di esposizione, sono stati controllati gli organismi all'interno dei contenitori per contare gli eventuali morti (Tab. 4).

Tab. 4: numero di organismi morti per contenitore dopo 48 ore.

Concentrazione	Decessi
Controllo	0/7
100 mg/L	1/7

Tab. 5: valori di pH e ossigeno disciolto dopo 48 ore di esposizione

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,61	8,44
100 mg/L	8,64	8,50

Dopodiché tutti i contenitori sono stati rimessi alle stesse condizioni per altre 24 ore di esposizione.

5° GIORNO DELLO STUDIO – DATA:05/04/2021

Dopo altre 24 ore di esposizione, sono stati controllati gli organismi all'interno dei contenitori per contare gli eventuali morti (Tab. 6).

Tab. 6: numero di organismi morti per contenitore dopo 72 ore.

Concentrazione	Decessi
Controllo	0/7
100 mg/L	1/7

Tab. 7: valori di pH e ossigeno disciolto dopo 72 ore di esposizione

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,63	8,58
100 mg/L	8,59	8,67

6° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 06/04/2021

Dopo altre 24 ore di esposizione, sono stati controllati gli organismi all'interno dei contenitori per contare gli eventuali morti (Tab. 8).

Tab. 8: numero di organismi morti per contenitore dopo 96 ore.

Concentrazione	Decessi
Controllo	0/7
100 mg/L	1/7

Tab. 9: valori di pH e ossigeno disciolto dopo 96 ore di esposizione

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,62	8,73
100 mg/L	8,53	8,85

6. Calcoli

Alla concentrazione limite di 100 mg/L, il campione induce la mortalità di uno solo dei sette Zebrafish in prova (1/7). Nel test limite non è comunque possibile calcolare la CL_{50} (vedi anche § 7).

6.1 Criteri di validità

I criteri di validità di cui al § 7 dell'OECD 203:2019 e § 1.5 del "REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 sono rispettati.

Dopo 96 ore di esposizione:

- la mortalità nel controllo è $\leq 10\%$ (nel test limite con 7 pesci è ammesso un solo decesso)
- i valori di pH sono rimasti approssimativamente nell'intervallo 6,0-8,5
- l'ossigeno disciolto non è mai sceso al di sotto del 60% del valore di saturazione in aria a 23°C e 1 atm (5,14 mg/L)
- la determinazione analitica della concentrazione del test non è applicabile per la matrice testata

7. Risultati

Tossicità acuta $CL_{50} > 100$ mg/L

Alla concentrazione limite di 100 mg/L, il campione induce la mortalità di uno solo dei sette Zebrafish in prova (1/7), valore accettabile per il test limite. La CL_{50} risulta, quindi, maggiore di 100 mg/L.

8. Archivi

La presente Relazione Tecnica, il registro attività e tutti i dati grezzi prodotti durante lo studio sono archiviati presso Lab-Control s.r.l.

9. Bibliografia

1. OECD/OCDE 203:2019 – OECD guideline for testing of chemicals – Fish, Acute Toxicity Test.
2. REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 DELLA COMMISSIONE del 30 maggio 2008 (testo consolidato 2017) 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) – Allegato Parte C, metodo C.1. – Tossicità acuta per i pesci.
3. UNI EN 14735:2005 - Caratterizzazione dei rifiuti. Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche.



STUDIO DI TOSSICITÀ ACUTA IN AMBIENTE ACQUATICO CON *DAPHNIA MAGNA STRAUS* (Concentrazione limite)

Campione in prova:

RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 1 (ID campione: 202104554)

Relazione Tecnica n.:

RT 210276 rev. 00
del 08/04/2021

Committente:

NEXTECO s.r.l.
Via Dei Quartieri, n. 45
36016 Thiene (VI)

STATO DELLE REVISIONI DEL DOCUMENTO

REV.	DATA	OGGETTO DELLA REVISIONE
00	08/04/2021	EMISSIONE DOCUMENTO

PROCEDIMENTO DI APPROVAZIONE

ESECUTORE PROVE		REDATTO		APPROVATO	
FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA
RESPONSABILE REPARTO ECOTOSSICOLOGIA	Tagliati Chiara	Vice DIRETTORE TECNICO	Zecchini Fulvio	DIRETTORE TECNICO	Pasi Manuela

SOMMARIO

1. Riassunto	3
2. Obiettivo dello studio.....	3
3. Campione oggetto dello studio	3
4. Sperimentazione.....	3
4.1 Metodo di prova	3
4.2 Sostanza di riferimento	3
4.3 Riferimenti normativi	3
4.4 Apparecchiatura utilizzata	3
4.5 Reagenti e materiali	4
4.6 Preparazione del campione	4
4.7 Altri dettagli della prova	4
5. Dati grezzi	5
6. Calcoli	5
6.1 Criteri di validità.....	6
7. Risultati e conclusioni	6
8. Archivi	6
9. Bibliografia.....	6

1. Riassunto

La presente relazione tecnica riassume in modo completo tutti i dati raccolti nel corso dello studio, come la preparazione della concentrazione limite, delle condizioni di esposizione delle daphnie al campione e i risultati calcolati.

I giovani dafnidi, di età inferiore a 24 ore alla partenza della prova, sono stati esposti al campione di prova, alla concentrazione limite di 100 mg/L, per un periodo di 48 ore. L'immobilizzazione è stata registrata a 24 ore e 48 ore e confrontata con i valori ottenuti dal controllo.

2. Obiettivo dello studio

Lo scopo del presente studio è quello di calcolare se la CE_{50} (concentrazione che immobilizza il 50% degli esemplari) a 48h del campione sia superiore alla concentrazione limite di 100 mg/L. Ciò al fine di verificare se ha un effetto negativo sul crostaceo d'acqua dolce *Daphnia magna* Straus e, quindi, se presenta tossicità acuta per l'ambiente acquatico.

3. Campione oggetto dello studio

In data 17/03/2021, Lab-Control ha provveduto a prelevare presso il punto indicato dal committente il campione, denominato RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 1, e a trasportarlo in giornata al proprio laboratorio di prova, dove è stato identificato con l'ID 202104554.

Il campione, una volta ricevuto, è stato conservato sigillato, a temperatura refrigerata e al riparo dalla luce solare prima dell'esecuzione delle prove e verrà conservato nell'archivio campioni in tali condizioni per un mese dopo la fine dello studio.

4. Sperimentazione

4.1 Metodo di prova

Il seguente studio fa riferimento al metodo "OECD/OCDE 202:2004 – OECD guideline for testing of chemicals – *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test" e al corrispettivo metodo del REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 del 30 maggio 2008 – Allegato Parte C, metodo C.2. Saggio di immobilizzazione acuta in *Daphnia* sp.

4.2 Sostanza di riferimento

Una sostanza di riferimento (controllo positivo) può essere testata per la CE_{50} come mezzo per assicurare che le condizioni di prova siano affidabili (§ 5, OECD 202:2004). Da metodo la CE_{50} del bicromato di potassio deve attestarsi all'interno dell'intervallo 0,6-2,1 mg/L.

4.4 Apparecchiatura utilizzata

- Scatole con pozzetti da 10 ml, ermeticamente chiuse, in plastica per evitare processi di adsorbimento o di rilascio di sostanze che possono interferire con il saggio.
- Incubatore capaci di operare alla temperatura di $20 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Lampade fluorescenti con illuminazione attenuata di circa 1500-2000 lux.
- Temporizzatore per il controllo del fotoperiodo.
- Ossimetro per la misurazione dell'ossigeno disciolto.
- pHmetro.
- Normale vetreria di laboratorio.

4.4 Reagenti e materiali

ORGANISMO TEST

Daphnia magna Straus è la specie sperimentale utilizzata (sub-allevamento come da indicazioni del metodo del lotto DM 121219, Daphtoxkit F magna, fornitore: Ecotox LDS). All'inizio della prova gli animali avevano meno di 24 ore di vita e, per ridurre la variabilità, non provenivano dalla prima nidiata e derivavano da un allevamento sano (senza segni di stress come alta mortalità, assenza di maschi e efippi, nessun ritardo nella produzione della prima nidiata, animali scoloriti assenti, ecc.). Gli animali sono stati mantenuti in condizioni di allevamento (luce, temperatura, mezzo) simili a quelle previste per la prova: la covata delle dafnie è stata mantenuta in acqua di diluizione alla temperatura di prova per almeno 48 ore prima dell'inizio del test.

ACQUA DI ALLEVAMENTO E DI DILUIZIONE

Si usa un'acqua minerale che si è dimostrata idonea durante diverse prove nel nostro laboratorio all'allevamento delle dafnie (§§ 10 e 11 OECD 202:2004). Essa possiede le seguenti caratteristiche fondamentali per l'allevamento:

- Residuo fisso a 180 °C = 181,6 mg/L
- pH = 7,61
- Conducibilità elettrica specifica a 20°C = 297,6 µS/cm

4.5 Preparazione del campione

Le concentrazioni testate sono state ottenute partendo da una soluzione madre con rapporto solido/liquido 1:10 S/L, preparata mediante lisciviazione del campione a granulometria = 4 mm con acqua di allevamento secondo la norma UNI EN 14735:2005 (EC-1-2008) "Caratterizzazione di rifiuti - Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche". La soluzione è stata messa poi ad agitare con miscelatore a rovesciamento a 10 rpm per 24 h a 23°C. L'estratto acquoso è stato lasciato sedimentare per 15 minuti. Infine, è stato filtrato su membrana 0,45 µm prima di allestire la prova.

Il controllo negativo è composto dalla sola acqua di allevamento.

4.7 Altri dettagli della prova

Gruppi test e controlli

I contenitori di prova sono stati riempiti con 10 ml di acqua di diluizione e soluzione del campione di prova; il rapporto di volume di aria/acqua nei recipienti era identico per prova e gruppi di controllo.

Le Dafnie sono state poi collocate nei recipienti di prova e, sia per la diluizione limite che per il controllo sono stati esaminati 20 animali, suddivisi in quattro gruppi di cinque animali ciascuno.

Concentrazione del test

Ai sensi del § 24 del metodo OECD 202:2004, è stata utilizzata la concentrazione limite di 100 mg/L.

Condizioni di incubazione

La temperatura è rimasta compresa a 20±1°C. È stato applicato un ciclo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. I recipienti di prova non sono stati aerati durante il test. Il test è stato effettuato senza regolazione del pH. I dafnidi non sono stati alimentati durante la prova.

Durata

La durata del test è stata di 48 ore, escluse le fasi di preparazione.

5. Dati grezzi

1° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 21/03/2021

Nel primo giorno dello studio è stato preparato l'estratto acquoso del campione come sopra descritto.

2° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 22/03/2021

A fine agitazione l'eluato è stato filtrato su filtri rapidi e poi su filtri con porosità 0,45 µm, quindi sono state realizzate le diluizioni da impiegare nelle prove.

Sono stati misurati i valori di valori di pH e di ossigeno disciolto per la diluizione preparata (Tab. 1).

Tab. 1: valori di pH e di ossigeno disciolto per la diluizione testata e per il controllo all'inizio del test.

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	7,98	9,75
100 mg/L	8,15	9,71

3° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 23/03/2021

Dopo 24 ore di esposizione, sono stati controllati gli organismi all'interno dei contenitori per contare gli eventuali immobilizzati (Tab. 2).

Tab. 2: numero di organismi immobilizzati per contenitore dopo 24 ore.

Concentrazione	1° REPLICA	2° REPLICA	3° REPLICA	4° REPLICA	TOTALE
Controllo	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20
100 mg/L	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20

Inoltre, sono stati registrati i valori di pH e di ossigeno disciolto (Tab. 3).

Tab. 3: valori di pH e di ossigeno disciolto per la concentrazione testata e per il controllo dopo 24 ore di esposizione

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,29	9,31
100 mg/L	7,98	9,35

Dopodiché tutti i contenitori sono stati rimessi alle stesse condizioni per altre 24 ore di esposizione.

4° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 24/03/2021

Dopo altre 24 ore di esposizione, sono stati controllati gli organismi all'interno dei contenitori per contare gli eventuali immobilizzati (Tab. 4).

Tab. 4: numero di organismi immobilizzati per contenitore dopo 48 ore.

Concentrazione	1° REPLICA	2° REPLICA	3° REPLICA	4° REPLICA	TOTALE
Controllo	1/5	0/5	0/5	0/5	1/20
100 mg/L	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20

Inoltre, sono stati registrati i valori di pH e di ossigeno disciolto (Tab. 5).

Tab. 5: valori di pH e di ossigeno disciolto per la concentrazione testata e per il controllo dopo 48 ore di esposizione

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,60	8,86
100 mg/L	7,80	8,99

6. Calcoli

Nei test in concentrazione limite non è possibile calcolare il valore di CE_{50} . Alla concentrazione limite di 100 mg/L, il campione testato non induce effetti negativi sui crostacei (immobilizzati = 0/20). Ovvero, ai sensi del § 24 "Test limite" del metodo OECD 202:2004, l'immobilizzazione non eccede il 10% degli individui totali delle repliche del campione: il valore di CE_{50} risulta, quindi, maggiore di 100 mg/L.

6.1 Criteri di validità

Il test è da considerarsi valido ai sensi del § 6, OECD 202:2004, dato che:

- nel controllo non è stata riscontrata immobilità degli organismi > 10%
- l'ossigeno disciolto alla fine del test, sia nella concentrazione testata del campione che nel controllo, è > 3 mg/L

Inoltre:

- tutti i valori di pH non sono variati più di 1,0 unità durante la prova
- controllo positivo su materiale di riferimento (MR): in un circuito nazionale di inter-calibrazione controllo positivo su materiale di riferimento (MR): nel circuito nazionale di inter-calibrazione Waste-Etox-3 organizzato da UNICHIM e conclusosi il 17/12/2020, per i valori di CE_{50} a 24h (una replica) e 48h (due repliche) di una soluzione di riferimento di bicromato di potassio sono stati trovati rispettivamente valori di Z-score pari a -1,43 e 0,00/0,74 (deve essere $-2 < Z < +2$)

7. Risultati

Tossicità acuta: $CE_{50} > 100$ mg/L

Alla concentrazione limite di 100 mg/L, il campione testato non induce effetti negativi sui crostacei (immobilizzati = 0/20). Il valore di CE_{50} risulta, quindi, maggiore di 100 mg/L.

8. Archivi

La presente Relazione Tecnica e tutti i dati grezzi prodotti durante lo studio sono archiviati presso Lab-Control s.r.l.

9. Bibliografia

1. OECD/OCDE 202:2004 – OECD guideline for testing of chemicals – *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test
2. REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 DELLA COMMISSIONE del 30 maggio 2008 (testo consolidato 2017) 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) – Allegato Parte C, metodo C.2. Saggio di immobilizzazione acuta in *Daphnia* sp.
3. UNI EN 14735:2005 - Caratterizzazione dei rifiuti. Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche.



STUDIO DI ECOTOSSICITÀ IN AMBIENTE ACQUATICO CON *PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA* (Concentrazione limite)

Campione in prova:

RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 1 (ID campione: 202104554)

Relazione Tecnica n.:
RT 210277 rev. 00
del 09/04/2021

Committente:
NEXTECO s.r.l.
Via Dei Quartieri, n. 45
36016 Thiene (VI)

STATO DELLE REVISIONI DEL DOCUMENTO

REV.	DATA	OGGETTO DELLA REVISIONE
00	09/04/2021	EMISSIONE DOCUMENTO

PROCEDIMENTO DI APPROVAZIONE

ESECUTORE PROVE		REDATTO		APPROVATO	
FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA
RESPONSABILE REPARTO ECOTOSSICOLOGIA	Tagliati Chiara	Vice DIRETTORE TECNICO	Zecchini Fulvio	DIRETTORE TECNICO	Pasi Manuela

SOMMARIO

1. Riassunto	3
2. Obiettivo dello studio.....	3
3. Campione oggetto dello studio	3
4. Sperimentazione.....	3
4.1 Metodo di prova	3
4.2 Sostanza di riferimento	3
4.3 Apparecchiatura utilizzata	3
4.4 Reagenti.....	4
4.5 Preparazione del campione	4
4.6 Altri dettagli della prova	5
5. Dati grezzi	6
6. Calcoli	7
6.1 Analisi statistica	9
6.2 Criteri di validità.....	10
7. Risultati e conclusioni	14
8. Archivi	14
9. Bibliografia.....	14

1. Riassunto

La presente relazione tecnica riassume in modo completo tutti i dati raccolti nel corso dello studio, come la preparazione della concentrazione limite, le condizioni di esposizione delle alghe al campione e i risultati calcolati.

Le alghe, in crescita esponenziale alla partenza della prova, sono state esposte al campione di prova, alla concentrazione limite concordata col committente di 100 mg/L, per un periodo di 72 ore. La concentrazione algale è stata registrata a 24, 48 e 72 ore e confrontata con i valori ottenuti dal controllo.

2. Obiettivo dello studio

Lo scopo del presente studio è quello di determinare se il valore di CrE₅₀ (la concentrazione stimata che provoca una riduzione del 50% del tasso di crescita rispetto al controllo) del campione in prova sia maggiore della concentrazione limite testata di 100 mg/L sull'alga d'acqua dolce *Pseudokirchneriella subcapitata* (conosciuta anche come *Selenastrum capricornutum*), per valutare se questo campione possa presentare effetti di tossicità acuta per l'ambiente acquatico. Verrà valutata anche la NOEC (No Observed Effect Concentration) per stimare possibili effetti di tossicità cronica del campione.

3. Campione oggetto dello studio

In data 17/03/2021, Lab-Control ha provveduto a prelevare presso il punto indicato dal committente il campione, denominato RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 1, e a trasportarlo in giornata al proprio laboratorio di prova, dove è stato identificato con l'ID 202104554.

Il campione, una volta ricevuto, è stato conservato sigillato, a temperatura refrigerata e al riparo dalla luce solare prima dell'esecuzione delle prove e verrà conservato nell'archivio campioni in tali condizioni per un mese dopo la fine dello studio.

4. Sperimentazione

4.1 Metodo di prova

Il metodo di prova utilizzato è l'OECD 201:2006 (Annex 5 corrected 2011) "GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test".

4.2 Sostanza di riferimento

Una sostanza di riferimento (controllo positivo), es. il bicromato di potassio, può essere testata per la CrE₅₀ come mezzo per assicurare che le condizioni di prova siano affidabili (§ 12, OECD 201:2006).

4.3 Apparecchiatura utilizzata

- Celle lunghe 10 cm con capacità di 25ml, in polistirene per evitare processi di adsorbimento o di rilascio di sostanze che possono interferire con il saggio e dotate di tappo.
- Incubatore, capace di operare alla temperatura di 23 ± 2°C.
- Lampade fluorescenti che diano una illuminazione continua superiore a 6000 lux.
- pH-metro
- Autoclave
- Normale vetreria di laboratorio
- Spettrofotometro

4.4 Reagenti

ORGANISMO TEST

L'alga *Pseudokirchneriella subcapitata* è la specie sperimentale utilizzata (sub-coltivazioni secondo metodo dell'ALGALTOXKIT F lotto SC290920, fornitore: Ecotox LDS).

All'inizio della prova, la coltura si trova in fase di crescita esponenziale.

ACQUA DI COLTIVAZIONE E DI DILUIZIONE

L'acqua si prepara aggiungendo un appropriato volume di soluzione stock disciogliendo i sali in acqua distillata seguendo le quantità indicate nella tabella seguente.

Nutrienti	Concentrazione
<i>Stock solution 1: macro nutrienti</i>	
NH ₄ Cl	1.5 g/L
MgCl ₂ •6H ₂ O	1.2 g/L
CaCl ₂ •2H ₂ O	1.8 g/L
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.5 g/L
KH ₂ PO ₄	0.16 g/L
<i>Stock solution 2: ferro</i>	
FeCl ₃ •6H ₂ O	64 mg/L
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	100mg/L
<i>Stock solution 3: elementi in tracce</i>	
H ₃ BO ₃	185 mg/
MnCl ₂ •4H ₂ O	415 mg/L
ZnCl ₂	3 mg/L
CoCl ₂ •6H ₂ O	1.5mg/L
CuCl ₂ •2H ₂ O	0.01 mg/L
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	7 mg/L
<i>Stock solution 4: bicarbonato</i>	
NaHCO ₃	50 g/L

Le soluzioni stock vanno sterilizzate mediante filtrazione o mediante autoclave.

Preparazione del medium di crescita

Il medium di crescita si prepara aggiungendo a 1 litro di medium finito 10 mL della stock solution 1, 1 mL della stock solution 2, 1 mL della stock solution 3 e 1 mL della stock solution 4. Si porta a volume con acqua distillata. Prima dell'uso, si satura di ossigeno lasciandola a contatto con l'aria durante la notte, o insufflando aria per circa 30 minuti. Dopo tale operazione, se necessario, viene aggiustato il pH a 8,1±0,2 usando acido idroclorico 1 mol/L o idrossido di sodio 1 mol/L.

4.5 Preparazione del campione

Le concentrazioni testate sono state ottenute partendo da una soluzione madre con rapporto solido/liquido 1:10 S/L, preparata mediante lisciviazione del campione a granulometria = 4 mm con acqua di allevamento secondo la norma UNI EN 14735:2005 (EC-1-2008) "Caratterizzazione di rifiuti - Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche". La soluzione è stata messa poi ad agitare con miscelatore a rovesciamento a 10 rpm per 24 h a 23°C. L'estratto acquoso è stato lasciato sedimentare per 15 minuti. Infine, è stato filtrato su membrana 0,45 µm prima di allestire la prova.

Il controllo negativo è composto dalla sola acqua di coltivazione.

4.6 Altri dettagli della prova

Gruppi test e controlli

Per ottenere il medium da mettere in prova col campione sono stati utilizzati appropriati volumi dell'eluato e dell'inoculo. Per il controllo negativo l'eluato è sostituito dal solo medium di coltura delle alghe.

La densità cellulare iniziale era sufficientemente bassa da permettere una crescita esponenziale nella cultura di controllo durante la durata del test senza che il pH vari più di 1,5 unità circa.

Si preparano sei repliche per ogni concentrazione.

Si misura il pH di un campione di ogni concentrazione e del controllo.

Concentrazione del test

Ai sensi del § 42 del metodo OECD 201:2006, è stata effettuata una prova alla concentrazione limite di 100 mg/L.

Condizioni di incubazione

La temperatura di incubazione è di $23\pm 2^{\circ}\text{C}$. È stato applicato un ciclo di luce bianca continua a 6000-10000 lux. I recipienti di prova non sono stati aerati durante il test e, quest'ultimo, è stato effettuato senza regolazione del pH.

I contenitori utilizzati sono chiusi in modo da evitare contaminazioni dell'aria e ridurre l'evaporazione dell'acqua, ma non sono ermetici, pertanto permettono alla CO_2 di entrare nel contenitore.

Ogni giorno, prima della lettura, tutti i contenitori sono stati agitati e capovolti un paio di volte, in maniera tale da mantenere le cellule in sospensione e per facilitare il trasferimento della CO_2 dall'aria all'acqua e a sua volta per ridurre la variazione del pH.

Misure

È stata misurata la densità cellulare in ogni contenitore (inclusi i controlli) ogni 24 ore. La misurazione viene fatta tramite lettura della densità ottica allo spettrofotometro, usando la lunghezza d'onda impostata a 670 nm.

La densità cellulare nominale è utilizzata come densità cellulare iniziale come da metodo.

Alla fine del test, viene misurato il pH di un campione di ogni concentrazione e del controllo.

Durata

La durata del test è stata di 72 ore, escluse le fasi di preparazione.

5. Dati grezzi

1° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 21/03/2021

Nel primo giorno dello studio è stato preparato l'estratto acquoso del campione come sopra descritto.

2° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 22/03/2021

Fine agitazione dell'eluizione. L'eluato è stato filtrato su filtri rapidi e poi su filtri con porosità 0,45 µm. Ad ogni contenitore di reazione è stato aggiunto 1 mL di coltura algale.

Lettura iniziale alga per determinare la concentrazione algale di partenza per ogni contenitore: D.O. = 0,040. L'equazione del lotto di alghe utilizzato per ricavare la concentrazione algale espressa in cellule/mL viene indicata dal fornitore ed è la seguente:

$$y = 1506634x - 53184$$

Quindi la concentrazione algale di partenza è risultata essere $7,081 \times 10^3$ cellule/mL.

Sono stati misurati i valori iniziali di pH e di ossigeno disciolto (Tab. 1).

Tab. 1: valori di pH e di ossigeno disciolto per le varie diluizioni testate e per il controllo all'inizio del test

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,52	9,47
100 mg/L	8,87	9,45

3° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 23/03/2021

Dopo 24 ore di esposizione, sono stati letti i valori di assorbanza di ogni contenitore (Tab. 2).

Tab. 2: valori di assorbanza per contenitore nelle 6 repliche dopo 24 ore.

Conc.	DO 1	DO 2	DO 3	DO 4	DO 5	DO 6	Media DO
Controllo	0,073	0,081	0,079	0,075	0,080	0,080	0,078
100 mg/L	0,121	0,081	0,082	0,100	0,096	0,093	0,096

Dopodiché, tutti i contenitori sono stati rimessi alle stesse condizioni per altre 24 ore di esposizione.

4° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 24/03/2021

Dopo altre 24 ore di esposizione, sono stati letti i valori di assorbanza di ogni contenitore (Tab. 3).

Tab. 3: valori di assorbanza per contenitore nelle 6 repliche dopo 48 ore.

Conc.	DO 1	DO 2	DO 3	DO 4	DO 5	DO 6	Media DO
Controllo	0,182	0,184	0,227	0,196	0,210	0,205	0,201
100 mg/L	0,234	0,209	0,244	0,230	0,204	0,251	0,229

5° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 25/03/2021

Dopo altre 24 ore di esposizione, sono stati letti i valori di assorbanza di ogni contenitore (Tab. 4).

Tab. 4: valori di assorbanza per contenitore nelle 6 repliche dopo 72 ore.

Conc.	DO 1	DO 2	DO 3	DO 4	DO 5	DO 6	Media DO
Controllo	0,799	0,731	0,732	0,784	0,740	0,743	0,755
100 mg/L	0,781	0,779	0,777	0,783	0,780	0,770	0,778

Sono stati registrati i valori finali di pH e di ossigeno disciolto a 72h (Tab. 5).

Tab. 5: valori di pH e di ossigeno disciolto per le varie diluizioni testate e per il controllo alla fine del test

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	9,32	9,92
100 mg/L	9,33	9,96

6. Calcoli

Come primo passaggio è stata calcolata la densità cellulare, espressa in cellule/mL, per ogni valore di assorbanza letto nei tre giorni del test. A tal fine si è usata l'equazione della retta di regressione fornita dal produttore del kit, già riportata:

$$y = 1506634x - 53184$$

Una volta ottenute le concentrazioni algali, se ne calcola la media.

Tab. 6: concentrazioni algali e valori medi dopo 24h di incubazione nelle 6 repliche, espressi in cellule/mL, per il campione testato

Conc.	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Media conc.
Controllo	5,680E+04	6,885E+04	6,584E+04	5,981E+04	6,735E+04	6,735E+04	6,433E+04
100 mg/L	1,291E+05	6,885E+04	7,036E+04	9,748E+04	9,145E+04	8,693E+04	9,070E+04

Tab. 7: concentrazioni algali e valori medi dopo 48h di incubazione nelle 6 repliche, espressi in cellule/mL, per il campione testato

Conc.	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Media conc.
Controllo	2,210E+05	2,240E+05	2,888E+05	2,421E+05	2,632E+05	2,557E+05	2,491E+05
100 mg/L	2,994E+05	2,617E+05	3,144E+05	2,933E+05	2,542E+05	3,250E+05	2,913E+05

Tab. 8: concentrazioni algali e valori medi dopo 72h di incubazione nelle 6 repliche, espressi in cellule/mL, per il campione testato

Conc.	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Media conc.
Controllo	1,151E+06	1,048E+06	1,050E+06	1,128E+06	1,062E+06	1,066E+06	1,084E+06
100 mg/L	1,123E+06	1,120E+06	1,117E+06	1,127E+06	1,122E+06	1,107E+06	1,119E+06

Ponendo in un grafico di dispersione le misure di logaritmo naturale (ln) della densità cellulare (cellule/mL) rispetto alla concentrazione del campione testato e al tempo di misurazione, si sono tracciate le curve di crescita per la concentrazione limite e per il controllo. Una curva lineare indica che la crescita è esponenziale, mentre un livellamento indica che le colture sono entrate in fase stazionaria.

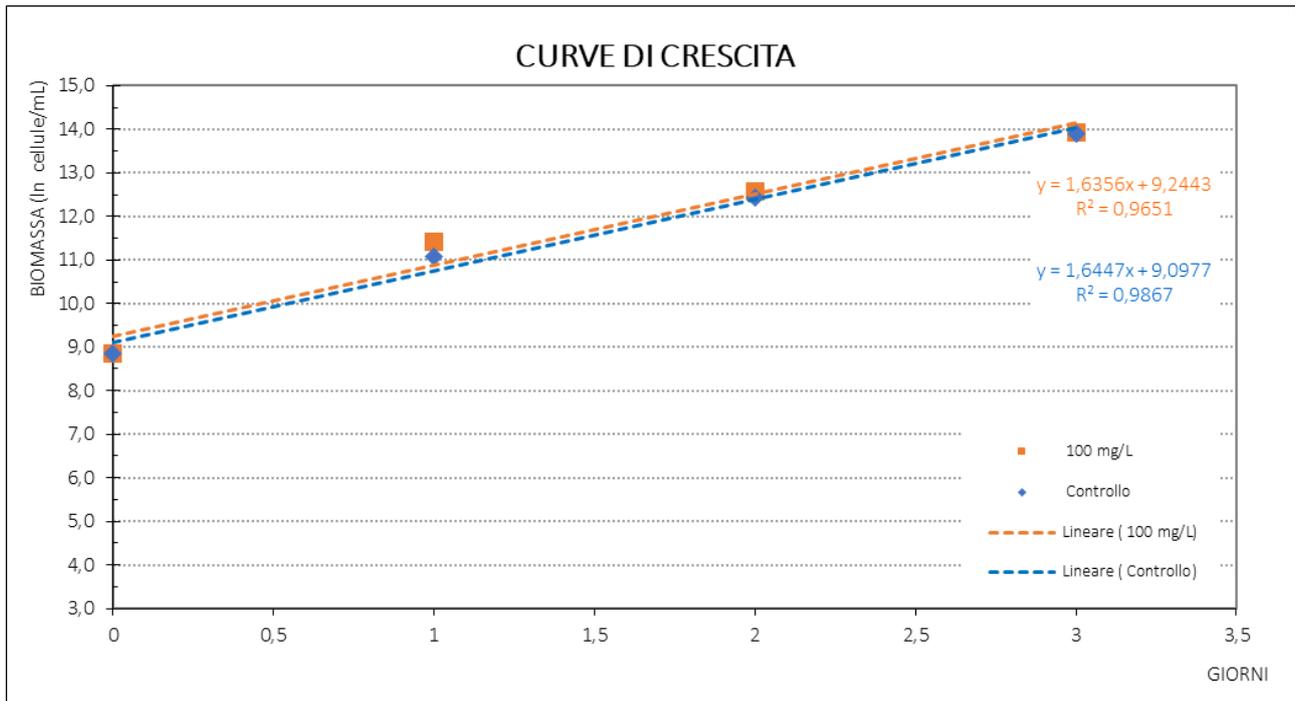


Fig. 1: curve di crescita algale a 72h della concentrazione limite e del controllo negativo. Biomassa in scala logaritmica (ln). La pendenza della retta rappresenta il tasso specifico di crescita (§44, OECD 201:2006).

Dopodiché si è calcolato il tasso di crescita specifico medio giornaliero, μ , per ogni coltura test, usando la seguente equazione:

$$\mu = \frac{\ln x_L - \ln x_0}{t_L - t_0}$$

Dove:

t_0 è il tempo di inizio del test

t_L è il tempo di fine del test (o il tempo dell'ultima misurazione durante il periodo di crescita esponenziale nelle colture di controllo)

x_0 è la densità cellulare nominale iniziale

x_L è la densità cellulare misurata al tempo t_L

Tab.9: tassi di crescita specifici del controllo e del campione per replica e per giorno

	Replica	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5	Rep. 6	Media	CV	CV%	%I _r
$\mu_{i,j}$ 0-1	Controllo	2,08	2,27	2,23	2,13	2,25	2,25	2,20	0,078	3,5	-14,6
	100 mg/L	2,90	2,27	2,30	2,62	2,56	2,51	2,53	0,232	9,2	
$\mu_{i,j}$ 1-2	Controllo	1,36	1,18	1,48	1,40	1,36	1,33	1,35	0,098	7,3	12,3
	100 mg/L	0,84	1,34	1,50	1,10	1,02	1,32	1,19	0,241	20,3	
$\mu_{i,j}$ 2-3	Controllo	1,65	1,54	1,29	1,54	1,39	1,43	1,47	0,128	8,7	8,4
	100 mg/L	1,32	1,45	1,27	1,35	1,48	1,23	1,35	0,102	7,6	
$\mu_{i,j}$ medio	Controllo							1,68	0,025	1,5	

%I_r = percentuale di inibizione del tasso di riproduzione medio giornaliero

Confrontando i valori del tasso medio di crescita a 72h del bianco e delle concentrazioni testate, si può calcolare l'inibizione percentuale del tasso di crescita %I_r con la formula di cui al § 50 del metodo OECD 201:2006 (Tab. 10):

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

Dove:

%I_r è la percentuale di inibizione della media del tasso di crescita specifico

μ_C è il valore medio del tasso di crescita specifico medio del gruppo di controllo

μ_T è la media del tasso di crescita specifico della replica del trattamento T

Tab.10: tassi di crescita specifici per concentrazione a 72h nelle 6 repliche

Tasso di crescita giornaliero medio a 72h (ln cellule/mL/giorno)								
Replica	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5	Rep. 6	Media	%I _r
Controllo*	1,697	1,666	1,666	1,690	1,670	1,671	1,677	---
100 mg/L	1,689	1,688	1,687	1,690	1,688	1,684	1,688	-0,65%

*: fattore di crescita biomassa controllo = 153,09

6.1 Analisi statistica

Si riporta di seguito l'analisi statistica (Tab. 11) per il confronto del tasso di crescita del controllo e della concentrazione limite del campione. I dati utilizzati per i valori di tasso di crescita nell'analisi statistica sono quelli della Tab. 10. Per l'analisi della normalità delle serie di dati dei replicati si è utilizzato il test di Shapiro-Wilk, con controllo dei dati anomali mediante test di Huber. Sia le serie di dati del campione che quella del controllo sono risultate distribuite normalmente e non sono stati trovati dati anomali.

Tab.11: confronto statistico tra tasso di crescita del controllo e della concentrazione limite a 72h nelle 6 repliche

Tasso di crescita			Test F a due campioni per varianze																																		
Replica	Controllo	100 mg/L																																			
Rep. 1	1,697	1,689																																			
Rep. 2	1,666	1,688																																			
Rep. 3	1,666	1,687																																			
Rep. 4	1,690	1,690																																			
Rep. 5	1,670	1,688																																			
Rep. 6	1,671	1,684																																			
Media	1,677	1,688																																			
%I _r = -0,65%																																					
			<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th></th> <th>Controllo</th> <th>100 mg/L</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Media</td> <td>1,6767807</td> <td>1,6877125</td> </tr> <tr> <td>Varianza</td> <td>0,000178</td> <td>4,184E-06</td> </tr> <tr> <td>Osservazioni</td> <td>6</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>gdl</td> <td>5</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>F</td> <td>42,532821</td> <td></td> </tr> <tr> <td>P(F<=f) una coda</td> <td>0,0004238</td> <td></td> </tr> <tr> <td>F critico una coda</td> <td>5,0503291</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Controllo	100 mg/L	Media	1,6767807	1,6877125	Varianza	0,000178	4,184E-06	Osservazioni	6	6	gdl	5	5	F	42,532821		P(F<=f) una coda	0,0004238		F critico una coda	5,0503291										
	Controllo	100 mg/L																																			
Media	1,6767807	1,6877125																																			
Varianza	0,000178	4,184E-06																																			
Osservazioni	6	6																																			
gdl	5	5																																			
F	42,532821																																				
P(F<=f) una coda	0,0004238																																				
F critico una coda	5,0503291																																				
			<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th></th> <th>Controllo</th> <th>100 mg/L</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Media</td> <td>1,6767807</td> <td>1,6877125</td> </tr> <tr> <td>Varianza</td> <td>0,000178</td> <td>4,184E-06</td> </tr> <tr> <td>Osservazioni</td> <td>6</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>Differenza ipotizzata per le medie</td> <td>0</td> <td></td> </tr> <tr> <td>gdl</td> <td>5</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Stat t</td> <td>-1,984043</td> <td></td> </tr> <tr> <td>P(T<=t) una coda</td> <td>0,0520195</td> <td></td> </tr> <tr> <td>t critico una coda</td> <td>2,0150484</td> <td></td> </tr> <tr> <td>P(T<=t) due code</td> <td>0,104039</td> <td></td> </tr> <tr> <td>t critico due code</td> <td>2,5705818</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Controllo	100 mg/L	Media	1,6767807	1,6877125	Varianza	0,000178	4,184E-06	Osservazioni	6	6	Differenza ipotizzata per le medie	0		gdl	5		Stat t	-1,984043		P(T<=t) una coda	0,0520195		t critico una coda	2,0150484		P(T<=t) due code	0,104039		t critico due code	2,5705818	
	Controllo	100 mg/L																																			
Media	1,6767807	1,6877125																																			
Varianza	0,000178	4,184E-06																																			
Osservazioni	6	6																																			
Differenza ipotizzata per le medie	0																																				
gdl	5																																				
Stat t	-1,984043																																				
P(T<=t) una coda	0,0520195																																				
t critico una coda	2,0150484																																				
P(T<=t) due code	0,104039																																				
t critico due code	2,5705818																																				

Per verificare se siamo in presenza di due serie con uguale varianza o meno, è stato usato l'apposito test F. Col test t sono state confrontate le medie del tasso di crescita nel campione a 100 mg/L e nel controllo negativo, a 72h. A seguito dei test risulta che, alla concentrazione limite testata di 100 mg/L, non vi è una differenza statisticamente significativa del tasso di crescita medio di *Pseudokirchneriella subcapitata* tra controllo e campione. Pertanto, avremo CrE₅₀ > 100 mg/L e NOEC > 100 mg/L.

6.2 Criteri di validità

Il test è da considerarsi valido, dato che:

- La biomassa del controllo a 72h rispetto all'inizio del test è risultata essere cresciuta di un fattore maggiore del 16 richiesto dal metodo (p.to 11 OECD 201:2006)
- il coefficiente medio di variazione section-by-section del tasso di crescita specifico nel controllo non eccede il 35% (p.to 11 della OECD 201:2006)
- il coefficiente di variazione del tasso di crescita medio del controllo durante l'intero test è inferiore al 7% (p.to 11 della OECD 201:2006)
- La CrE₅₀ a 72h della sostanza di riferimento bicromato di potassio (K₂Cr₂O₇) è accettabile (vedi Box 1)

BOX 1 CrE₅₀ della sostanza di riferimento: bicromato di potassio (K₂Cr₂O₇)

Tab. B1: valori di assorbanza (o densità ottica, DO) per la sostanza di riferimento dopo 24 ore nelle 3 repliche

Conc.	DO 1	DO 2	DO 3	Media DO
Controllo	0.090	0.100	0.108	0.099
0,18 mg/L	0.089	0.107	0.083	0.093
0,32 mg/L	0.087	0.083	0.084	0.085
0,56 mg/L	0.083	0.078	0.094	0.085
1,00 mg/L	0.076	0.069	0.069	0.071
1,80 mg/L	0.079	0.083	0.071	0.078

Tab. B2: valori di assorbanza (o densità ottica, DO) per la sostanza di riferimento dopo 48 ore nelle 3 repliche

Conc.	DO 1	DO 2	DO 3	Media DO
Controllo	0.322	0.350	0.375	0.349
0,18 mg/L	0.334	0.373	0.322	0.343
0,32 mg/L	0.374	0.334	0.357	0.355
0,56 mg/L	0.253	0.235	0.287	0.258
1,00 mg/L	0.091	0.092	0.084	0.089
1,80 mg/L	0.046	0.046	0.040	0.044

Tab. B2: valori di assorbanza (o densità ottica, DO) per la sostanza di riferimento dopo 72 ore nelle 3 repliche

Conc.	DO 1	DO 2	DO 3	Media DO
Controllo	0.322	0.350	0.375	0.349
0,18 mg/L	0.334	0.373	0.322	0.343
0,32 mg/L	0.374	0.334	0.357	0.355
0,56 mg/L	0.253	0.235	0.287	0.258
1,00 mg/L	0.091	0.092	0.084	0.089
1,80 mg/L	0.046	0.046	0.040	0.044

Lettura iniziale alga per determinare la concentrazione algale di partenza per ogni contenitore: D.O. = 0,040. L'equazione del lotto di alghe utilizzato (Algatokit Ecotox lotto SC260618) per ricavare la concentrazione algale espressa in cellule/ml viene indicata dal fornitore ed è la seguente:

$$y = 1325476x - 47874$$

Tab. B4: concentrazioni algali e valori medi nelle 3 repliche dopo 24h di incubazione, espressi in cells/mL

Conc.	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Media conc.
Controllo	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03
0,18 mg/L	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03
0,32 mg/L	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03
0,56 mg/L	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03
1,00 mg/L	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03
1,80 mg/L	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03

Tab. B5: concentrazioni algali e valori medi nelle 3 repliche dopo 48h di incubazione, espressi in cells/mL

Conc.	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Media conc.
Controllo	7.142E+04	8.467E+04	9.528E+04	8.379E+04
0,18 mg/L	7.009E+04	9.395E+04	6.214E+04	7.540E+04
0,32 mg/L	6.744E+04	6.214E+04	6.347E+04	6.435E+04
0,56 mg/L	6.214E+04	5.551E+04	7.672E+04	6.479E+04
1,00 mg/L	5.286E+04	4.358E+04	4.358E+04	4.668E+04
1,80 mg/L	5.684E+04	6.214E+04	4.623E+04	5.507E+04

Tab. B6: concentrazioni algali e valori medi nelle 3 repliche dopo 72h di incubazione, espressi in cells/mL

Conc.	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Media conc.
Controllo	3.789E+05	4.160E+05	4.492E+05	4.147E+05
0,18 mg/L	3.948E+05	4.465E+05	3.789E+05	4.068E+05
0,32 mg/L	4.479E+05	3.948E+05	4.253E+05	4.227E+05
0,56 mg/L	2.875E+05	2.636E+05	3.325E+05	2.945E+05
1,00 mg/L	7.274E+04	7.407E+04	6.347E+04	7.009E+04
1,80 mg/L	1.310E+04	1.310E+04	5.145E+03	1.045E+04

Sono state tabulate le misure di densità cellulare rispetto alla concentrazione del campione testato e al tempo di misurazione. È stata tracciata una curva per ogni concentrazione test e per il controllo, come un grafico della media della densità cellulare contro il tempo. Una curva di crescita lineare indica una crescita esponenziale, mentre un livellamento indica che le colture sono entrate in fase stazionaria.

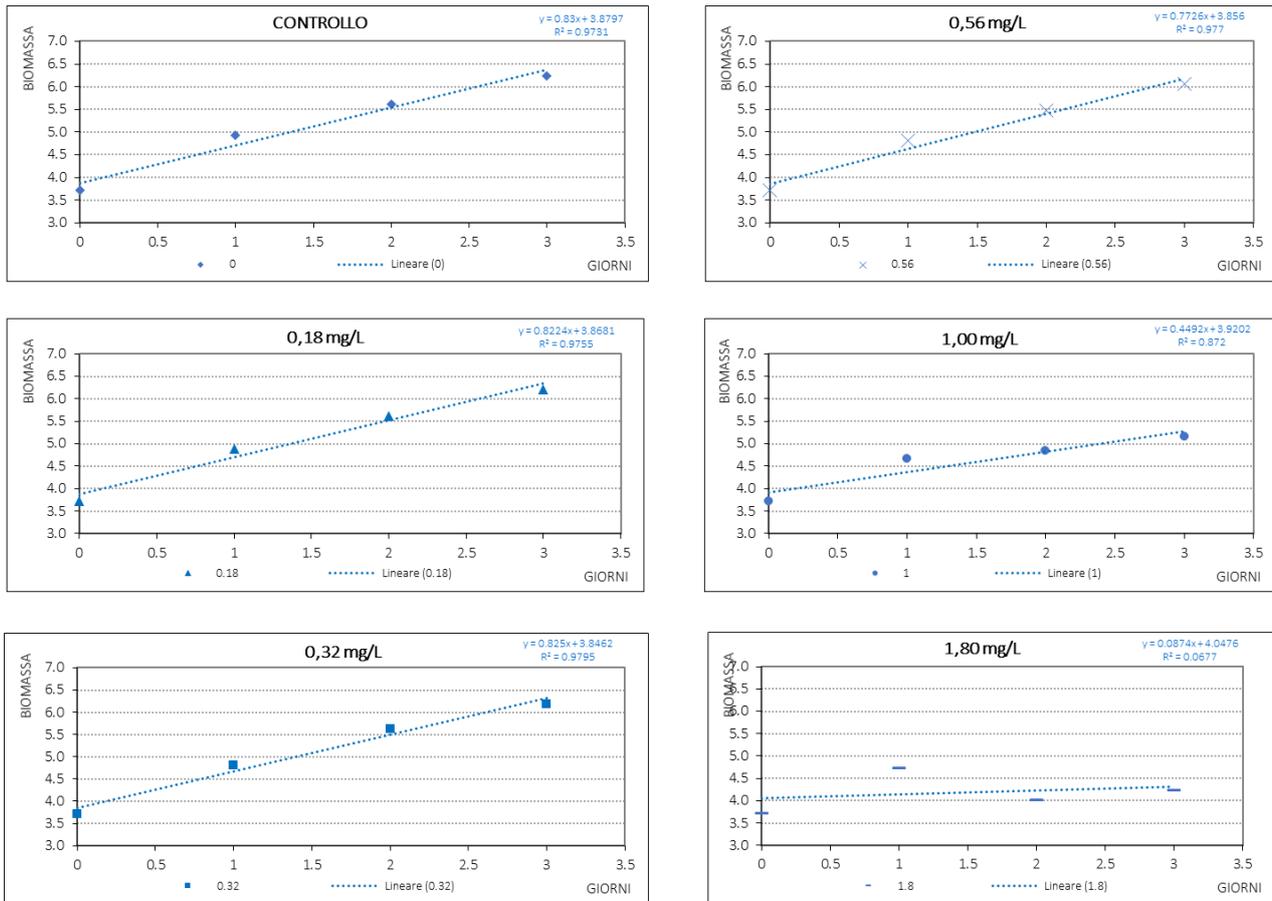


Fig. B1: curve di crescita algale alle varie concentrazioni testate del bicromato di potassio

Dopodiché si è calcolato il tasso di crescita specifico medio, μ , per ogni coltura test, usando la seguente equazione:

$$\mu = \frac{\ln x_L - \ln x_0}{t_L - t_0}$$

Dove:

t_0 è il tempo di inizio del test

t_L è il tempo di fine del test (o il tempo dell'ultima misurazione durante il periodo di crescita esponenziale nelle colture di controllo)

x_0 è la densità cellulare nominale iniziale

x_L è la densità cellulare misurata al tempo t_L

È stato calcolato poi il valore medio di μ per ogni replica dei gruppi test e del controllo. Da questi valori, è stata calcolata la percentuale di inibizione per ogni replica dei gruppi test, tramite la seguente equazione:

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100$$

Dove:

$I_{\mu i}$ è la percentuale di inibizione (tasso di crescita) per la concentrazione test i ;

μ_i è il tasso di crescita medio per la concentrazione test i ;

μ_c è il tasso di crescita medio per il controllo.

Tab. B7: tassi crescita specifica e % inibizione alle varie diluizioni della sostanza di riferimento

Tasso a 72h	Conc.	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Tasso medio	CV	CV%	%I _r
μ _j 0-3	Controllo	5.78	5.85	5.88	5.84	0.050	0.86	0.0
	0,18 mg/L	5.74	5.79	5.72	5.75	0.034	0.60	1.5
	0,32 mg/L	5.71	5.69	5.72	5.70	0.014	0.24	2.3
	0,56 mg/L	5.41	5.34	5.51	5.42	0.089	1.63	7.1
	1,00 mg/L	3.39	3.32	3.22	3.31	0.086	2.60	43.3
	1,80 mg/L	1.27	1.12	1.27	1.22	0.090	7.35	79.1

Infine, è stato realizzato il grafico dose inibizione. Mediante regressione logaritmica è stato trovato il valore di CrE₅₀ = **1,12 mg/L** in corrispondenza col valore %I_r = 50%, con intervallo di confidenza al 95% pari a **1,07-1,18 mg/L**. In base ai risultati del circuito inter-laboratorio a cui questi dati si riferiscono, il valore di accettabilità per la CrE₅₀ è 0,32-1,48 mg/L.

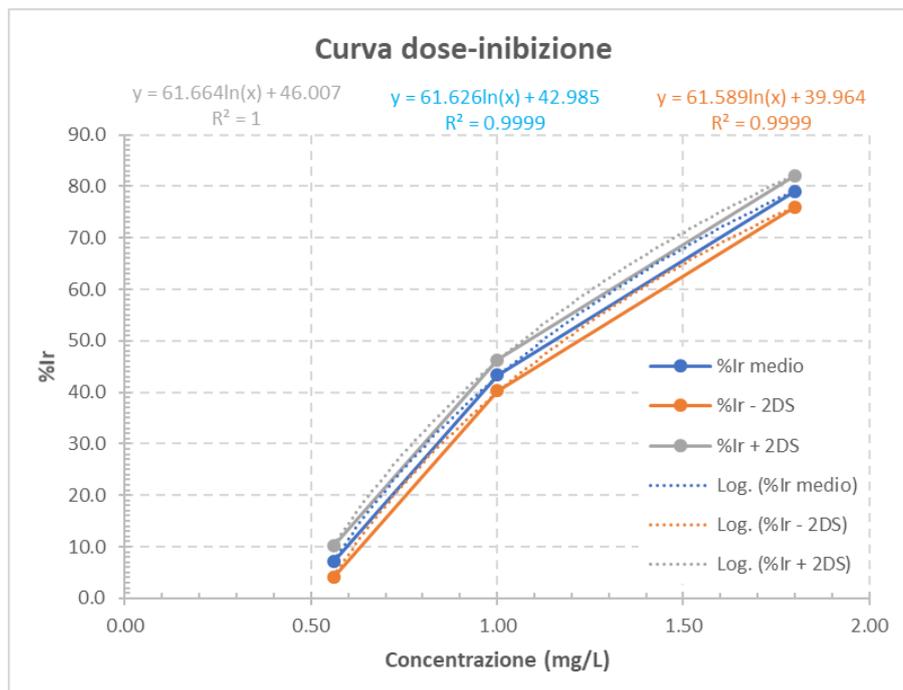


Fig. B2: curva dose-inibizione per il bicromato di potassio

7. Risultati e conclusioni

Tossicità acuta: CrE₅₀ > 100 mg/L

Dopo 72h di crescita alla concentrazione limite di 100 mg/L, il campione testato non ha influenza significativa sul tasso di crescita delle alghe rispetto al controllo. Pertanto, possiamo affermare che la CrE₅₀ a 72h (concentrazione alla quale avremo $%I_r \geq 50\%$) sarà maggiore di 100 mg/L.

Tossicità cronica: NOEC > 100 mg/L

Poiché la concentrazione limite testata non ha effetto statisticamente significativo, possiamo considerare che anche la NOEC (No Observed Effect Concentration) sia maggiore di 100 mg/L.

8. Archivi

La presente Relazione Tecnica e tutti i dati grezzi prodotti durante lo studio sono archiviati presso Lab-Control s.r.l.

9. Bibliografia

1. OECD/OCDE 201:2011 - OECD guideline for testing of chemicals – Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.
2. UNI EN ISO 8692:2005 - Prova di inibizione della crescita di alghe di acqua dolce per mezzo di alghe verdi unicellulari.
3. REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 DELLA COMMISSIONE del 30 maggio 2008 (testo consolidato 2017) 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) – Allegato Parte C, metodo C.3. Saggio di inibizione della crescita delle alghe.
4. UNI EN 14735:2005 - Caratterizzazione dei rifiuti. Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche.



STUDIO DI TOSSICITÀ CRONICA IN AMBIENTE ACQUATICO CON *DAPHNIA MAGNA STRAUS* (Concentrazione limite)

Campione in prova:

RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 1 (ID campione: 202104554)

Relazione Tecnica n.:

RT 210278 rev. 00
del 09/04/2021

Committente:

NEXTECO s.r.l.
Via Dei Quartieri, n. 45
36016 Thiene (VI)

STATO DELLE REVISIONI DEL DOCUMENTO

REV.	DATA	OGGETTO DELLA REVISIONE
00	09/04/2021	EMISSIONE DOCUMENTO

PROCEDIMENTO DI APPROVAZIONE

ESECUTORE PROVE		REDATTO		APPROVATO	
FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA
RESPONSABILE REPARTO ECOTOSSICOLOGIA	Tagliati Chiara	Vice DIRETTORE TECNICO	Zecchini Fulvio	DIRETTORE TECNICO	Pasi Manuela

Sommario

1. Riassunto	3
2. Obiettivo dello studio.....	3
3. Campione oggetto dello studio	3
4. Sperimentazione.....	3
4.1 Metodo di prova	3
4.2 Apparecchiatura utilizzata.....	3
4.3 Reagenti.....	4
4.4 Preparazione.....	4
4.5 Metodo di prova	4
5. Dati grezzi	5
6. Risultati.....	6
6.1 Analisi statistica dei dati	6
6.2 Criteri di validità della prova.....	7
7. Conclusioni	7
8. Archivi	7
9. Bibliografia.....	7

1. Riassunto

La presente Relazione Tecnica riassume in modo completo tutti i dati raccolti nel corso dello studio.

I giovani dafnidi, di età inferiore a 24 ore alla partenza della prova, sono esposti al campione di prova a concentrazione limite di 1 mg/L in 10 repliche con un singolo individuo progenitore, per 21 giorni. A intervalli regolari viene controllata la produzione di prole dei singoli progenitori e la mortalità nei vari contenitori. I valori ritrovati nei contenitori con il campione in prova vengono poi confrontati statisticamente col bianco rappresentato dal solo medium di allevamento.

2. Obiettivo dello studio

Lo scopo del presente studio in concentrazione limite è stato quello di valutare la tossicità cronica sul crostaceo d'acqua dolce *Daphnia magna* Straus, ovvero se il valore della NOEC (No Observed Effect Concentration) del campione in prova è superiore alla concentrazione limite (§ 36, OECD 211:2012) testata di 1 mg/L.

3. Campione oggetto dello studio

In data 17/03/2021, Lab-Control ha provveduto a prelevare presso il punto indicato dal committente il campione, denominato RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 1, e a trasportarlo in giornata al proprio laboratorio di prova, dove è stato identificato con l'ID 202104554.

Il campione, una volta ricevuto, è stato conservato sigillato, a temperatura refrigerata e al riparo dalla luce solare prima dell'esecuzione delle prove e verrà conservato nell'archivio campioni in tali condizioni per un mese dopo la fine dello studio.

4. Sperimentazione

4.1 Metodo di prova

Il presente studio fa riferimento al metodo "OECD/OCDE 211:2012 – OECD guideline for testing of chemicals – *Daphnia magna* Reproduction Test", riportato anche nel REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 metodo C.20. Prova di riproduzione con *Daphnia magna*.

4.2 Apparecchiatura utilizzata

- Piastre con pozzetti da 10 mL, con coperchio, in plastica per evitare processi di adsorbimento o di rilascio di sostanze che possono interferire con il saggio.
- Incubatore capaci di operare alla temperatura di $20 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Lampade fluorescenti con illuminazione attenuata di circa 1500-2000 lux.
- Temporizzatore per il controllo del fotoperiodo.
- Ossimetro per la misurazione dell'ossigeno disciolto.
- pHmetro
- Normale vetreria di laboratorio.

4.3 Reagenti

Organismo test

Daphnia magna Straus è la specie sperimentale utilizzata (sub-allevamento come da indicazioni del metodo del lotto DM 121219, Daphtokit F magna, fornitore: Ecotox LDS). All'inizio della prova gli animali avevano meno di 24 ore di vita e, per ridurre la variabilità, non provenivano dalla prima nidiata e derivavano da un allevamento sano (senza segni di stress come alta mortalità, assenza di maschi e efippi, nessun ritardo nella produzione della prima nidiata, animali scoloriti assenti, ecc.). Gli animali sono stati mantenuti in condizioni di allevamento (luce, temperatura, mezzo) simili a quelle previste per la prova: la covata delle dafnie è stata mantenuta in acqua di diluizione alla temperatura di prova per almeno 48 ore prima dell'inizio del test.

Acqua di allevamento e di diluizione

Si usa un'acqua minerale che si è dimostrata idonea durante diverse prove nel nostro laboratorio all'allevamento delle dafnie (§§ 10 e 11 OECD 202:2004). Essa possiede le seguenti caratteristiche fondamentali per l'allevamento:

- Residuo fisso a 180 °C = 181,6 mg/L
- pH = 7,61
- Conducibilità elettrica specifica a 20°C = 297,6 µS/cm

4.4 Preparazione

Le concentrazioni testate sono state ottenute partendo da una soluzione madre con rapporto solido/liquido 1:10 S/L, preparata mediante lisciviazione del campione a granulometria = 4 mm con acqua di coltivazione secondo la norma UNI EN 14735:2005 (EC-1-2008) "Caratterizzazione di rifiuti - Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche". La soluzione è stata messa poi ad agitare con miscelatore a rovesciamento a 10 rpm per 24 h a 23°C. L'estratto acquoso è stato lasciato sedimentare per 15 minuti. Infine, è stato filtrato su membrana 0,45 µm prima di allestire la prova.

Il controllo negativo è composto dalla sola acqua di coltivazione.

4.5 Metodo di prova

Gruppi test e controlli

I contenitori di prova sono stati riempiti con 50 ml di acqua di diluizione e soluzioni del campione di prova; il rapporto di volume di aria/acqua nei recipienti è identico per prova e gruppi di controllo. Le dafnie sono state poi collocate nei recipienti di prova. Sono stati utilizzati, per ogni concentrazione e per i controlli, 10 animali, ciascuno in un suo contenitore.

Concentrazione del test

Ai sensi del § 36 dell'OECD 211:2012, il test è stato condotto alla concentrazione limite di 1 mg/L.

Condizioni di incubazione

La temperatura è rimasta nell'intervallo 20±1°C. È stato applicato un ciclo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. I recipienti di prova non sono stati aerati durante il test. Il test è stato effettuato senza regolazione del pH. I dafnidi sono stati alimentati giornalmente durante la prova con l'alga *Scenedesmus dimorphus* in quantità pari a 0.1 - 0.2 mg C/dafnia/giorno. Il medium di allevamento è stato cambiato ogni 2 giorni. Il pH nelle varie repliche si è mantenuto nell'intorno dell'intervallo di accettabilità da metodo (pH = 6-9), così come la concentrazione di ossigeno che deve essere > 3 mg/L.

Durata

La durata del test è stata di 21 giorni, dal 19/03/2021 al 09/04/2021, escluse le fasi di preparazione.

5. Dati grezzi

I dati grezzi sono riportati nelle due tabelle seguenti.

Tab. 1. Dati di riproduzione del controllo negativo (bianco)

Replica bianco	19/03/2021	22/03/2021	24/03/2021	26/03/2021	29/03/2021	31/03/2021	02/04/2021	06/04/2021	09/04/2021	Somma	Media	DS
1	0	0	0	0	31	52	23	40	53	199	39,8	22,9
2	0	0	0	0	32	37	0	60	2	131	26,2	22,6
3	0	0	0	0	36	51	0	42	44	173	34,6	23,1
4	0	0	0	0	21	52	32	16	45	166	33,2	20,6
5	0	0	0	23	41	0	44	55	35	198	39,6	22,5
6	0	0	0	0	30	43	0	76	0	149	29,8	27,5
7	0	0	0	0	24	33	0	63	5	125	25,0	22,1
8	0	0	0	0	45	0	43	44	35	167	33,4	22,2
9	0	0	0	0	31	43	0	58	0	132	26,4	23,0
10	0	0	0	0	37	0	25	3	0	65	13,0	13,8
Somma	0	0	0	23	328	311	167	457	219	1505	301	
Media	0,0	0,0	0,0	2,3	32,8	31,1	16,7	45,7	21,9	150,5	30,1	
DS	0,0	0,0	0,0	7,3	7,3	22,3	18,8	22,1	22,2			

Tab. 2. Dati di riproduzione del campione in concentrazione limite 1 mg/L.

Replica campione	19/03/2021	22/03/2021	24/03/2021	26/03/2021	29/03/2021	31/03/2021	02/04/2021	06/04/2021	09/04/2021	Somma	Media	DS
1	0	0	0	0	29	52	0	72	20	173	34,6	26,9
2	0	0	0	0	45	0	40	38	36	159	31,8	21,1
3	0	0	0	0	5	20	16	16	32	89	17,8	11,6
4	0	0	0	0	42	34	23	8	1	108	21,6	16,7
5	0	0	0	0	26	36	37	52	29	180	36,0	20,3
6	0	0	0	0	15	23	0	16	27	81	16,2	11,2
7	0	0	0	0	28	50	28	52	66	224	44,8	26,3
8	0	0	0	0	40	44	0	75	0	159	31,8	28,2
9	0	0	0	0	31	53	0	74	42	200	40,0	28,6
10	0	0	0	0	33	39	0	47	0	119	23,8	20,1
Somma	0	0	0	0	294	351	144	450	253	1492	298,4	
Media	0	0	0	0,0	29,4	35,1	14,4	45,0	25,3	149,2	29,8	
DS	0,0	0,0	0,0	0,0	12,2	16,8	16,5	25,1	21,1			

6. Risultati

6.1 Analisi statistica dei dati

Per l'analisi della normalità delle serie di dati delle medie di prole dei 10 replicati si è utilizzato il test di Shapiro-Wilk, con verifica di eventuali dati anomali mediante test di Huber, in caso di serie non normali. Sia le serie di dati del campione che quella del controllo sono risultate distribuite normalmente.

Per verificare se vi è un effetto alla concentrazione limite, la media di prole del campione è stata confrontata con quella del bianco attraverso i test statistici (§ 58; OECD 211:2012) di cui seguono i risultati.

Tab. 3: confronto statistico tra numerosità della prole del controllo e della concentrazione limite a fine test

Replica	Media bianco	Media campione
1	39,8	34,6
2	26,2	31,8
3	34,6	17,8
4	33,2	21,6
5	39,6	36,0
6	29,8	16,2
7	25,0	44,8
8	33,4	31,8
9	26,4	40,0
10	13,0	23,8
Media	30,1	29,8

Test F a due campioni per varianze		
	Media bianco	Media campione
Media	30,1	29,84
Varianza	63,61111111	92,30044444
Osservazioni	10	10
gdl	9	9
F	0,689174483	
P(F<=f) una coda	0,294042283	
F critico una coda	0,314574906	

Test t: due campioni assumendo varianze diverse		
	Media bianco	Media campione
Media	30,1	29,84
Varianza	63,61111111	92,30044444
Osservazioni	10	10
Differenza ipotizzata per le medie	0	
gdl	17	
Stat t	0,065846727	
P(T<=t) una coda	0,474134012	
t critico una coda	1,739606726	
P(T<=t) due code	0,948268023	
t critico due code	2,109815578	

Per verificare se siamo in presenza di due serie con uguale varianza o meno, è stato usato l'apposito test F. Tramite Test t sono state confrontate le medie di prole nel campione a 1 mg/L e nel controllo negativo (bianco).

A seguito dei test statistici, risulta che non vi è differenza significativa tra le medie della dose testata e del controllo. Possiamo, quindi, affermare che alla concentrazione limite di 1 mg/L il campione non ha influenza sulla riproduzione di *Daphnia magna* Straus, ovvero avremo $CE_{50} > 1$ mg/L e $NOEC > 1$ mg/L.

6.2 Criteri di validità della prova

Nel test sono rispettati i parametri di validazione del test:

- per controllo e campione: mortalità dei progenitori $\leq 20\%$ alla fine del test;
- per il controllo: media dei figli prodotti per ciascun animale sopravvissuto alla fine del test ≥ 60 .

Sono inoltre rispettate tutte le condizioni ambientali richieste durante il test (temperatura, pH, concentrazione di O₂ ecc., Tab. 4).

Tab. 4: valori di pH e di ossigeno disciolto per le varie diluizioni testate e per il controllo all'inizio (t_0) e alla fine (t_{21}) del test

Concentrazione	pH _{t₀}	[O ₂] _{t₀} (mg/L)	pH _{t₂₁}	[O ₂] _{t₂₁} (mg/L)
Controllo	8,03	9,94	8,17	8,45
1 mg/L	7,89	9,94	8,38	8,91

7. Conclusioni

Tossicità cronica NOEC > 1 mg/L

Alla concentrazione limite di 1 mg/L il campione non ha effetto statisticamente significativo sulla riproduzione di *Daphnia magna* Straus. La NOEC (No Observed Effect Concentration) sarà quindi maggiore di 1 mg/L.

8. Archivi

La presente Relazione Tecnica e tutti i dati grezzi prodotti durante lo studio sono archiviati presso Lab-Control s.r.l.

9. Bibliografia

1. OECD/OCDE 211:2012 – OECD guideline for testing of chemicals – *Daphnia magna* Reproduction Test
2. REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 DELLA COMMISSIONE del 30 maggio 2008 (testo consolidato 2019) 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). Allegato C, C.20. Prova di riproduzione con *Daphnia magna*
3. UNI EN 14735:2005 (EC-1-2008) "Caratterizzazione di rifiuti - Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche"



PROVA SULLE PIANTE TERRESTRI: EMERGENZA E CRESCITA DELLE PLANTULE (OECD 208:2006)

Campione in prova:
RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 1
 (Campione ID 202104554)

Relazione tecnica n.:
RT 201279 rev. 00
 del 07/04/2021

Committente:
NEXTECO s.r.l.
Via Dei Quartieri, n. 45
36016 Thiene (VI)

STATO DELLE REVISIONI DEL DOCUMENTO

REV.	DATA	OGGETTO DELLA REVISIONE
00	07/04/2021	EMISSIONE DOCUMENTO

PROCEDIMENTO DI APPROVAZIONE

ESECUTORE PROVE		REDDATTO		APPROVATO	
FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA
RESPONSABILE REPARTO ECOTOSSICOLOGIA	Tagliati Chiara	Vice DIRETTORE TECNICO	Zecchini Fulvio	DIRETTORE TECNICO	Pasi Manuela

Sommario

1. Riassunto	3
2. Obiettivo dello studio	3
3. Campione oggetto dello studio	3
4. Sperimentazione.....	3
4.1 Preparazione del campione.....	3
4.2 Condizioni di esecuzione	4
4.3 Validità del test.....	4
4.4 Strumentazione	4
4.5 Reagenti e materiali.....	4
5. Dati grezzi e calcoli	5
6. Risultati	6
7. Archivi	7
8. Bibliografia.....	7

1. Riassunto

La presente relazione tecnica riassume in modo completo tutti i dati raccolti nel corso dello studio, come la preparazione del campione prima del test, le condizioni di esposizione delle piante scelte e i risultati calcolati.

2. Obiettivo dello studio

La prova di fitotossicità sulle piante è stata eseguita secondo il metodo OECD 208:2006 "OECD Guidelines for the Testing of Chemicals - Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test", ripreso dal metodo C.31 "Prova sulle piante terrestri: emergenza delle plantule e crescita delle plantule" del Reg. CE 440/2008.

La presente prova di fitotossicità valuta gli effetti dell'esposizione alla sostanza chimica in esame contenuta nel terreno (o in un'altra matrice del suolo appropriata) sull'emergenza delle plantule e sulle fasi iniziali di crescita delle piante superiori. I semi sono messi a contatto con il terreno trattato con la sostanza chimica in esame, i cui effetti sono valutati generalmente 14-21 giorni dopo l'emergenza del 50% delle plantule nel gruppo di controllo. Gli endpoint misurati sono la valutazione visiva dell'emergenza delle plantule, il peso dei germogli secchi (in alternativa, il peso dei germogli freschi), nonché la valutazione degli effetti nocivi visibili su diverse parti della pianta. Tali misurazioni e osservazioni sono confrontate con quelle effettuate su piante di controllo non trattate.

Il test è qui eseguito in un'unica concentrazione limite (§ 4; OECD 208:2006). Pertanto, si valuterà se la CE_{50} (la concentrazione con effetto di riduzione del 50% della germinabilità e/o della biomassa formatasi) sia superiore rispetto alla concentrazione testata.

Gli effetti ecotossici sono stati valutati su due piante superiori, una monocotiledone e una dicotiledone:

- *Lepidium sativum* L. (crescione; dicotiledone Classe Magnoliopsida, Ordine Capparales, Famiglia Brassicaceae)
- *Hordeum vulgare* L. (orzo; monocotiledone Classe Liliopsida, Sottoclasse Commelinidae, Ordine Poales, Famiglia Poaceae).

3. Campione oggetto dello studio

In data 17/03/2021, Lab-Control ha provveduto a prelevare presso il punto indicato dal committente il campione, denominato RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 1, e a trasportarlo in giornata al proprio laboratorio di prova, dove è stato identificato con l'ID 202104554.

Il campione, una volta ricevuto, è stato conservato sigillato, a temperatura refrigerata e al riparo dalla luce solare prima dell'esecuzione delle prove e verrà conservato nell'archivio campioni in tali condizioni per un mese dopo la fine dello studio.

4. Sperimentazione

4.1 Preparazione del campione

I potenziali effetti negativi sulle piante vengono valutati sul campione, miscelato al substrato di riferimento (torba e sabbia silicea in rapporto 3:1 p/p), alla concentrazione limite di 1000 mg/kg (§25; OECD 208:2006). Per ciascuna delle due specie vegetali usate, ogni vaso è stato riempito con circa 200 g di miscela substrato+ campione (solo substrato per il controllo). Sulla superficie di 78,5 cm² sono stati seminati 5 semi (da metodo devono essere usati 3-10 semi per 100 cm²), coperti da un sottile strato di materiale inerte (sabbia silicea). Le prove sono state eseguite in quattro repliche. Prima di posizionare i vasi in incubatore, è stata aggiunta acqua in ogni vaso, in modo da raggiungere il 70-100% della capacità di ritenzione idrica.

4.2 Condizioni di esecuzione

Il test viene condotto nelle condizioni ambientali necessarie per la normale crescita delle piante, che vengono mantenute costanti grazie ad un adeguato e frequente monitoraggio (temperatura, umidità, luminosità ecc.). Durante il test sono state adottate le seguenti condizioni:

- temperatura: $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- umidità: $70\% \pm 25\%$
- fotoperiodo: 16 ore di luce / 8 ore di buio
- intensità luminosa: $350 \pm 50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$

Durante il periodo di incubazione le piante sono state osservate frequentemente per verificare l'eventuale presenza di mortalità o segni di fitotossicità.

Alla fine del test sono state valutate ed annotate la percentuale di germinazione e la biomassa di ciascun vaso del campione rispetto a quelle del controllo.

4.3 Validità del test

Il test viene considerato valido quando (§ 6, OECD 208:2006):

- la percentuale di germinazione nel gruppo di controllo è $\geq 70\%$ per le specie vegetali utilizzate;
- il gruppo di controllo non esibisce effetti fitotossici visibili (come clorosi, necrosi, appassimento, deformazioni fogliari ecc.);
- durante il test almeno il 90% delle piante germinate nel gruppo di controllo sopravvivono fino a fine test;
- tutti gli organismi provengono dalla stessa fonte;
- tutte le camere di crescita utilizzate sono identiche per condizioni di esposizione e per numero di vasi contenuti.

4.4 Strumentazione

Comune strumentazione di laboratorio e in particolare:

- Camere di crescita delle piante (incubatori)
- Lampade temporizzate per fotoperiodo
- Vasi in plastica per piante con diametro = 10 cm
- Bilancia analitica
- Essiccatore
- Normale vetreria da laboratorio
- Frigorifero per conservazione

4.5 Reagenti e materiali

Comuni materiali di laboratorio e in particolare:

- Acqua distillata
- Sabbia
- Torba
- Semi di crescione
- Semi di orzo

5. Dati grezzi e calcoli

1° giorno di studio - 19/03/2021

Preparazione del substrato di riferimento e semina del crescione e dell'orzo come sopra indicato.

4° giorno di studio - 23/03/2021

Il 50% dei semi del gruppo di controllo è risultato germinato sia su orzo che su crescione.

18° giorno di studio - 06/04/2021

Sono state raccolte le piante germogliate e sono stati verificati

- il numero di semi germinati su 5 totali,
- la biomassa totale a fresco (peso fresco),
- la biomassa totale e dopo essiccazione a 105 °C (peso secco).

I dati grezzi sono riportati nelle tabelle che seguono, dove P1 = tara, P2 = peso lordo fresco e P3 = peso lordo secco.

Per ogni concentrazione, è stata calcolata la percentuale di germinazione data dalla media dei semi germinati nel compost campione rispetto alla media di quelli germinati nel compost testimone (controllo):

$$\%G = \frac{(media\ n\ semi\ germinati)_{campione}}{(media\ n\ semi\ germinati)_{controllo}} \times 100$$

Analogamente si è proceduto alla valutazione della percentuale di biomassa (fresca o secca):

$$\%BIOMASSA = \frac{(media\ biomassa\ fresca\ o\ secca)_{campione}}{(media\ biomassa\ fresca\ o\ secca)_{controllo}} \times 100$$

Di seguito si riportano i dati grezzi e i valori, in percentuale rispetto al controllo, di germinazione e di biomassa fresca o secca, per le due piante valutate nel corso del presente studio.

		CRESCIONE				
		Peso (g)				
Controllo	N° germinati	P1	P2	P3	P. Fresco	P. Secco
prova 1	5	2,1645	2,3264	2,1761	0,1619	0,0116
prova 2	5	2,1414	2,2843	2,1510	0,1429	0,0096
prova 3	5	2,1573	2,3483	2,1711	0,1910	0,0138
prova 4	5	2,1489	2,3347	2,1608	0,1858	0,0119
Media	5				0,1704	0,0117
		Peso (g)				
Campione	N° germinati	P1	P2	P3	P. Fresco	P. Secco
prova 1	4	2,1428	2,3194	2,1531	0,1766	0,0103
prova 2	3	2,1724	2,3081	2,1817	0,1357	0,0093
prova 3	4	2,1473	2,2629	2,1576	0,1156	0,0103
prova 4	4	2,1310	2,2362	2,1419	0,1052	0,0109
Media	3,8				0,1333	0,0102
Percentuali	75,0				78,2	87,0

		ORZO				
		Peso (g)				
Controllo	N° germinati	P1	P2	P3	P. Fresco	P. Secco
prova 1	5	2,1359	3,9184	2,2799	1,7825	0,1440
prova 2	5	2,1652	4,1177	2,3212	1,9525	0,1560
prova 3	5	2,1416	3,9136	2,2761	1,7720	0,1345
prova 4	5	2,1623	4,2838	2,3346	2,1215	0,1723
Media	5				1,9071	0,1517

		Peso (g)				
Campione	N° germinati	P1	P2	P3	P. Fresco	P. Secco
prova 1	4	2,1604	3,6099	2,2929	1,4495	0,1325
prova 2	4	2,1687	3,4740	2,2772	1,3053	0,1085
prova 3	4	2,1410	3,9125	2,2430	1,7715	0,1020
prova 4	5	2,1520	4,1323	2,3205	1,9803	0,1685
Media	4,3				1,6267	0,1279
Percentuali	85,0				85,3	84,3

6. Risultati

Nelle due tabelle seguenti sono riportati le medie dei valori e l'intervallo di confidenza al 95%. I risultati vanno valutati in termini di germinabilità e peso secco (o in alternativa peso fresco) espressi come percentuale rispetto al controllo.

Crescione a 1000 mg/kg

Valori	Germinati (%)	Peso Fresco (%)	Peso Secco (%)
prova 1	80,0	103,6	87,8
prova 2	60,0	79,6	79,3
prova 3	80,0	67,8	87,8
prova 4	80,0	61,7	93,0
media	75,0	78,2	87,0
DS	10,0	18,5	5,7
Min (media-2DS)	55,0	58,2	67,0
Max (media+2DS)	95,0	98,2	107,0

Di conseguenza, poiché tutte le percentuali calcolate sono superiori al 50%, si può affermare che:

- per la germinabilità $CE_{50} > 1000 \text{ mg/kg}$
- per la biomassa (peso secco) $CE_{50} > 1000 \text{ mg/kg}$
- per la biomassa (peso fresco) $CE_{50} > 1000 \text{ mg/kg}$

Orzo a 1000 mg/kg

Valori	Germinati (%)	Peso Fresco (%)	Peso Secco (%)
prova 1	80,0	76,0	87,3
prova 2	80,0	68,4	71,5
prova 3	80,0	92,9	67,2
prova 4	100,0	103,8	111,1
media	85,0	85,3	84,3
DS	10,0	16,0	19,8
Min (media-2DS)	65,0	65,3	64,3
Max (media+2DS)	105,0	105,3	104,3

Di conseguenza, poiché tutte le percentuali calcolate sono superiori al 50%, si può affermare che:

- per la germinabilità $CE_{50} > 1000 \text{ mg/kg}$
- per la biomassa (peso secco) $CE_{50} > 1000 \text{ mg/kg}$
- per la biomassa (peso fresco) $CE_{50} > 1000 \text{ mg/kg}$

La prova è da considerarsi valida, in quanto sono rispettate tutte le condizioni di validità di cui al § 4.3.

7. Archivi

La presente Relazione Tecnica, il registro attività e tutti i dati grezzi prodotti durante lo studio sono archiviati presso Lab-Control s.r.l.

8. Bibliografia

- OECD/OCDE 208:2006 "OECD guideline for testing of chemicals – Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test"
- REGOLAMENTO (CE) 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) – Allegato Parte C, metodo C.31 "Prova sulle piante terrestri: emergenza delle plantule e crescita delle plantule"

RAPPORTO DI PROVA Nr.: R202105971 del: 09-apr-21 Rev. 0

Richiedente: NEXTECO s.r.l. Via DEI QUARTIERI, 45 - CAP 36016 - THIENE - VI	ID richied: C17063
Committente: NEXTECO s.r.l. Via DEI QUARTIERI, 45 - CAP 36016 - THIENE - VI	ID cliente: C17063

Campione di: RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 2	N° lotto/partita: --
Punto di prel.: --	
Proveniente da: C/O CANTIERE BBT, SOTTO ATTRAVERSAMENTO ISARCO FORTEZZA (BZ)	
Nr. Accettazione (ID MAC): M2101258 ID campione: 202104555 Data ricev.: 17-mar-21 Ora ricev.: 17:40	
Descrizione: --	
Categoria Merceologica: PRODOTTI SOLIDI IN GENERE	

Verbale campionamento Nr. (MAC Est): 31841 Data Camp.: 17-mar-21 Ora camp.: 14:40
Metodo di campionamento: (1) UNI 10802:2013
Resp campionamento: Ns. Tecnico Milani p.i. Matteo
Note sul campionamento: La massa del campione di laboratorio è di circa 2 kg. Preparazione del campione ed applicazione del piano di campionamento in accordo alla norma UNI EN 14899:2006 Campione formato da n° 3 aliquote denominate A,B,C.
Condizioni Ambientali: Sereno
Informazioni dichiarate dal committente: Rifiuto GN BPN Codice CER: 170504

RISULTATI DI PROVA

Parametri Metodo di Prova	Unità Mis.	Valori riscontrati	Limiti	LOQ	Data Inizio Data Fine	Note
TEST ECOTOSSICOLOGICI	--	--	--	--		
Test di tossicità acuta con Zebrafish (conc. limite - determinazione CL50)	mg/L	>100	--	--	02/04/2021	
OECD/OCDE 203 (2019)					06/04/2021	
Test di tossicità acuta con Daphnia magna Straus (conc. limite - determinazione CE50)	mg/L	>100	--	--	22/03/2021	
OECD/OCDE 202 (2004)					24/03/2021	
Test di tossicità con Pseudokirchneriella subcapitata (conc. limite - determinazione CrE50 e NOEC)	mg/L CrE50 mg/L NOEC	>100 >100	--	--	21/03/2021	
OECD/OCDE 201 (2011)					24/03/2021	
Test di tossicità cronico con Daphnia magna (conc. limite NOEC)	mg/L	>1	--	--	19/03/2021	
OECD/OCDE 211 (2012)					09/04/2021	
Determinazione di effetti ecotossici su piante superiori (conc. Limite) - CE50	mg/kg	>1000	--	--	19/03/2021	
OECD 208 (2006)					06/04/2021	

LOQ = Limite di Quantificazione del metodo di prova utilizzato.

s.s. = sostanza secca tq o non specificato = come campionato

§ = Le prove contrassegnate da questo simbolo sono state eseguite in subappalto da laboratorio esterno.

F=Valore riscontrato superiore alla normativa di riferimento se indicata (Limiti).

L'Intervallo di confidenza e/o l'incertezza di misura non sono stati considerati ai fini della valutazione della conformità ai requisiti e/o specifiche.

Nel caso di ricerche multianalita, le somme riportano la sommatoria dei parametri ricercati indicati nel presente rapporto di prova. Qualora i singoli analiti risultino tutti inferiori ai rispettivi LOQ, la somma sarà posta inferiore al limite di quantificazione più alto.

() Nei campioni di emissione in atmosfera, i valori riportati tra parentesi, se presenti, esprimono le concentrazioni degli inquinanti in flusso di massa. Per valori riscontrati elevati (ad es. microbiologici) i valori vengono espressi in forma esponenziale secondo il Sistema metrico Internazionale: ad es. $10E+06 = 10000000$, $54E+05 = 5400000$, dove E indica il numero di zeri da aggiungere alla cifra iniziale, questo per rendere più leggibile il rapporto di prova.

() Nei campioni di emissione in atmosfera, i valori riportati tra parentesi, se presenti, esprimono le concentrazioni degli inquinanti in flusso di massa. Per valori riscontrati elevati (ad es. microbiologici) i valori vengono espressi in forma esponenziale secondo il Sistema metrico Internazionale: ad es. $10E+06 = 10000000$, $54E+05 = 5400000$, dove E indica il numero di zeri da aggiungere alla cifra iniziale, questo per rendere più leggibile il rapporto di prova.

Note ai risultati di prova:

- Per la prova eseguita secondo il metodo "OECD/OCDE 203 (1992) Test di tossicità acuta con Zebrafish (conc. limite - determinazione CL50)" vedasi Relazione Tecnica RT210280
- Per la prova eseguita secondo il metodo "OECD/OCDE 202 (2004) Test di tossicità acuta con Daphnia magna Straus (conc. limite - determinazione CE50)" vedasi Relazione Tecnica RT210281
- Per la prova eseguita secondo il metodo "OECD/OCDE 201 (2011) Test di tossicità con Pseudokirchneriella subcapitata (conc. limite - determinazione CrE50 e NOEC)" vedasi Relazione Tecnica RT210282
- Per la prova eseguita secondo il metodo "OECD/OCDE 211 (2012) Test di tossicità cronico con Daphnia magna (conc. limite NOEC)" vedasi Relazione Tecnica RT210283
- Per la prova eseguita secondo il metodo "OECD 208 (2006) Determinazione di effetti ecotossici su piante superiori (conc. Limite) - CE50" vedasi Relazione Tecnica RT210284

Stato delle revisioni del rapporto di prova

Revisione	Data Rev.	Motivo Revisione
0	09-apr-21	prima emissione

Documento firmato digitalmente con firma autorizzata dall'ordine professionale ai sensi del Regolamento UE n. 910/2014 del 23/07/2014 e smi.

Direttore Tecnico

PASI Dott.ssa Chim.MANUELA

n°734 Ordine Int. Chimici Veneto

Per DATA INIZIO si intende la data di presa in carico del campione, per DATA FINE si intende la data di avvenuta verifica del dato analitico. I dati riportati nel presente Rapporto di Prova sono riferiti esclusivamente al campione sottoposto alle prove. La riproduzione parziale del presente Rapporto di Prova deve essere autorizzata per iscritto dal laboratorio. Un controcampione, se non deperibile o esaurito nel corso delle prove, è conservato presso il laboratorio per 30 giorni dalla data di emissione del rapporto di prova, salvo diversi accordi contrattuali. I dati grezzi ed i tracciati strumentali sono archiviati per 10 anni. (1) In assenza di indicazioni si intende che il campione è stato provato come pervenuto in laboratorio ed i dati di prelievo, la tipologia del campione e la provenienza del campione è stata indicata dal committente.

Azienda con Sistema di Gestione per la Qualità certificato UNI EN ISO 9001:2015 - Certificato CSQA n.131 - Registrazione IQ-Net n.IT-4818
Laboratorio inserito nell'elenco dei Laboratori accreditati dalla Regione Veneto ai sensi dell'art.54, comma 2 della L.R. n.33/1985
Laboratorio iscritto nel Registro Regionale del Veneto n.19 dei Laboratori non annessi alle industrie alimentari ai fini dell'autocontrollo ai sensi dell'accordo Stato - Regioni Rep. Atti n.78/CSR del 8 luglio 2010.
Laboratorio iscritto all'Albo dei Laboratori di Ricerca con Decreto Dirigenziale n.1417/Ric. Del 28 giugno 2005.
Laboratorio inserito con il DM 10 aprile 2009 nell'elenco dei laboratori competenti a prestare i servizi necessari per verificare la conformità dei fertilizzanti ed ammendanti ai sensi del Decreto Legislativo n. 75/2010.



**STUDIO DI TOSSICITÀ ACUTA
IN AMBIENTE ACQUATICO
CON *BRACHYDANIO RERIO* - ZEBRAFISH
(Concentrazione limite)**

Campione in prova:

**RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 2
(ID campione: 202104555)**

Relazione Tecnica n.:

**RT 210280 rev. 00
del 08/04/2021**

Committente:

**NEXTECO s.r.l.
Via Dei Quartieri, n. 45
36016 Thiene (VI)**

STATO DELLE REVISIONI DEL DOCUMENTO

REV.	DATA	OGGETTO DELLA REVISIONE
00	08/04/2021	EMISSIONE DOCUMENTO

PROCEDIMENTO DI APPROVAZIONE

ESECUTORE PROVE		REDATTO		APPROVATO	
FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA
RESPONSABILE REPARTO ECOTOSSICOLOGIA	Tagliati Chiara	Vice DIRETTORE TECNICO	Zecchini Fulvio	DIRETTORE TECNICO	Pasi Manuela

SOMMARIO

1. Riassunto	3
2. Obiettivo dello studio.....	3
3. Campione oggetto dello studio	3
4. Sperimentazione.....	3
4.1 Metodo di prova	3
4.2 Apparecchiatura utilizzata	3
4.3 Reagenti.....	4
4.4 Preparazione del campione	4
4.5 Altri dettagli della prova.....	4
5. Dati grezzi	6
6. Calcoli	8
6.1 Criteri di validità.....	8
7. Risultati e conclusioni	8
8. Archivi	8
9. Bibliografia.....	8

Autorizzazione utilizzo *Brachydanio rerio* a fini scientifici

Lab-Control è autorizzato Ministero della Salute, ai sensi del D.Lgs. 26/2014 “Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici”, quale stabilimento utilizzatore di *Brachydanio rerio* e altre specie ittiche a fini scientifici (autorizzazione n. 1/2015-UT del 29/01/2015).

Ogni stabilimento utilizzatore deve presentare un progetto di ricerca ex art. 31 del D.Lgs. 26/2014 per poter utilizzare vertebrati in laboratorio. In data 15/01/2021, il Ministero, con autorizzazione n. 40/2021-PR, ha approvato il nuovo progetto di Lab-Control (prot. C4BC0.0) “Test di tossicità acuta su pesci con metodo OECD 203:2019 e Reg. EU 440/2008 Allegato Parte C, metodo C.1, per l’attribuzione della caratteristica di pericolosità HP 14 (ecotossico) a sostanze/miscele chimiche e rifiuti”, come progetto di tipo regolatorio, soggetto ad approvazione di Fase A (generale) e di Fase B (specifica per ogni campione da testare). Prima di procedere alla prova con *B. rerio*, si deve inviare al Ministero una scheda descrittiva di Fase B per ogni campione da analizzare, attraverso il portale stabulari. Per l’autorizzazione di ogni scheda devono essere corrisposti i diritti di cui al D.M. 27/03/2019, Tariffa F – ex art. 31 e 33, D.Lgs. 26/2014. L’approvazione avviene entro 5 giorni lavorativi, trascorsi i quali il portale indica che si può procedere alla prova (silenzio/assenso).

1. Riassunto

La presente relazione tecnica riassume in modo completo tutti i dati raccolti nel corso dello studio, le condizioni di esposizione dei pesci alla concentrazione limite del campione e i risultati calcolati.

I pesci, di lunghezza totale raccomandata di 1-2 cm, sono esposti al campione di prova, aggiunto all'acqua, per un periodo di 96 ore. La mortalità viene registrata a 24, 48, 72 e 96 ore e confrontata con i valori ottenuti dal controllo.

2. Obiettivo dello studio

Lo scopo del presente test è stato quello di determinare l'effetto della concentrazione limite del campione di prova in ambiente acquatico, sul pesce d'acqua dolce *Brachydanio rerio*, per valutare se questo campione possa presentare effetti di tossicità acuta.

3. Campione oggetto dello studio

In data 17/03/2021, Lab-Control ha provveduto a prelevare presso il punto indicato dal committente il campione, denominato RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 2, e a trasportarlo in giornata al proprio laboratorio di prova, dove è stato identificato con l'ID 202104555.

Il campione, una volta ricevuto, è stato conservato sigillato, a temperatura refrigerata e al riparo dalla luce solare prima dell'esecuzione delle prove e verrà conservato nell'archivio campioni in tali condizioni per un mese dopo la fine dello studio.

4. Sperimentazione

4.1 Metodo di prova

Il seguente studio fa riferimento al metodo OECD/OCDE 203:2019 – OECD guideline for testing of chemicals - Fish, Acute Toxicity Test, integrato con le indicazioni del Regolamento CE 440/2008 - Allegato Parte C, C.1. Tossicità acuta per pesci.

4.2 Apparecchiatura utilizzata

- Acquari per la stabulazione dei pesci, dotati di pompa di calore, sistema filtrante e sistema di illuminazione.
- Recipienti aventi un volume di 5 L, in plastica trasparente per evitare processi di adsorbimento o di rilascio di sostanze che possono interferire con il saggio.
- Lampade fluorescenti che diano una illuminazione attenuata di circa 1500-2000 lux.
- Temporizzatore per il controllo del fotoperiodo.
- Termometri capaci di registrare la temperatura massima e minima.
- Pompe per acquari.
- Ossimetro per la misurazione dell'ossigeno disciolto.
- pH-metro.
- Equipaggiamento di laboratorio per la determinazione della durezza.
- Normale vetreria di laboratorio.

4.3 Reagenti

ORGANISMO TEST

Il *Brachydanio rerio* (Zebrafish) è la specie sperimentale utilizzata. Il fornitore è il Model Organism Facility Department of Cellular, Computational and Integrative Biology – CIBIO, University of Trento (fornitore autorizzato ai sensi dell'art. 20 del D.Lgs. 26/2014). I pesci utilizzati per il saggio erano in buona salute e non presentavano evidenti malformazioni, come dichiarato nel certificato rilasciato dal fornitore. I pesci provenivano da un singolo gruppo con lunghezza (1-2 cm) ed età simili. Sono stati mantenuti per 9 giorni (2 di assestamento e poi 7 di acclimatazione) nelle seguenti condizioni:

- densità degli animali: un carico di biomassa di 0,8 g/L;
- acqua: vedi paragrafo successivo;
- concentrazione dell'ossigeno disciolto: vedi paragrafo successivo;
- illuminazione: fotoperiodo da 12 a 16 ore al giorno;
- alimentazione: tre volte alla settimana o quotidianamente con sospensione 24 ore prima dell'inizio della prova.

ACQUA DI ALLEVAMENTO E DI DILUIZIONE

Per l'allevamento e le diluizioni è stata utilizzata acqua potabile, decantata per 24 ore al fine di eliminare il cloro residuo, non contaminata da concentrazioni potenzialmente pericolose di metalli pesanti o altri inquinanti. Tale acqua aveva le seguenti caratteristiche specificate da metodo:

- concentrazione $O_2 > 5,14$ mg/L a 23°C e 1 atm
- salinità = 0,16‰* (calcolata dalla conducibilità; deve essere $< 0,2$ ‰)
- pH = 7,7* (deve essere 6,0-8,5)
- durezza = 140 mg $CaCO_3/L$ * (deve essere 40-250 mg $CaCO_3/L$, preferibilmente < 180 mg $CaCO_3/L$)

*fonte dati: Acquevenete 2021 (www.acquevenete.it)

4.4 Preparazione del campione

Le concentrazioni testate sono state ottenute partendo da una soluzione madre con rapporto solido/liquido 1:10 S/L, preparata mediante lisciviazione del campione a granulometria = 4 mm con acqua di allevamento secondo la norma UNI EN 14735:2005 (EC-1-2008) "Caratterizzazione di rifiuti - Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche". La soluzione è stata messa poi ad agitare con miscelatore a rovesciamento a 10 rpm per 24 h a 23°C. L'estratto acquoso è stato lasciato sedimentare per 15 minuti. Infine, è stato filtrato su membrana 0,45 µm prima di allestire la prova.

Il controllo negativo è composto dalla sola acqua di allevamento.

4.5 Altri dettagli della prova

Gruppi test e controlli

I contenitori di prova sono stati riempiti con 3 L di acqua di diluizione e soluzione del campione di prova (solo acqua di diluizione per il controllo).

Come indicato al § 30 "Test limite" del metodo di prova OECD/OCDE 203:2019, al fine di ridurre il numero di esemplari utilizzati, può essere eseguita una prova preliminare con un solo contenitore con 7 pesci sia per il test che per il controllo. Se con 7-10 pesci per contenitore si registra al massimo un decesso, secondo la teoria

binomiale (equazione di Bernoulli con $p=q=50\%$) c'è almeno il 94-99% di probabilità che la CL_{50} sia maggiore della concentrazione limite testata.

Concentrazione del test

È stata utilizzata una concentrazione limite di prova pari a 100 mg/L.

Condizioni di esposizione

La prova è stata effettuata in modalità statica.

La temperatura è rimasta compresa nell'intervallo $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ed è stato applicato un ciclo di 16 ore di luce e 8 ore di buio, con intensità di 540-1000 lumen.

La densità degli individui in prova è di circa 0,8 g/L (peso umido).

La concentrazione di ossigeno $\geq 60\%$ (ovvero 5,14 mg/L a 23°C e 1 atm) del valore di saturazione in aria (8,56 mg/L a 23°C e 1 atm, fonte: FAO, 1987, ARAC/87/WP/12(9)).

I recipienti di prova non sono stati aerati durante il test, che è stato effettuato senza regolazione del pH.

I pesci non sono stati alimentati durante la prova.

Durata

La durata del test è stata di 96 ore, escluse le fasi di preparazione.

5. Dati grezzi

1° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 01/04/2021

Nel primo giorno dello studio è stato preparato l'estratto acquoso del campione come sopra descritto.

2° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 02/04/2021

L'eluato è stato filtrato su filtri rapidi e poi su filtri con porosità 0,45 µm. Quindi sono state realizzate le diluizioni necessarie. Per la concentrazione testata e per il controllo sono stati misurati giornalmente i valori di pH e di ossigeno disciolto (Tab. 1).

Tab. 1: valori di pH e ossigeno disciolto per la concentrazione testata e per il controllo all'inizio del test

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,62	8,14
100 mg/L	8,70	8,16

I pesci sono stati esaminati dopo le prime 2-4 ore e non si sono osservate mortalità o anomalie.

3° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 03/04/2021

Dopo 24 ore di esposizione sono stati controllati gli organismi all'interno dei contenitori per contare gli eventuali morti (Tab. 2).

Tab. 2: numero di organismi morti per contenitore dopo 24 ore.

Concentrazione	Decessi
Controllo	0/7
100 mg/L	0/7

Tab. 3: valori di pH e ossigeno disciolto per la concentrazione testata e per il controllo dopo 24 ore di esposizione

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,60	8,29
100 mg/L	8,66	8,35

Dopodiché tutti i contenitori sono stati rimessi alle stesse condizioni per altre 24 ore di esposizione.

4° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 04/04/2021

Dopo altre 24 ore di esposizione, sono stati controllati gli organismi all'interno dei contenitori per contare gli eventuali morti (Tab. 4).

Tab. 4: numero di organismi morti per contenitore dopo 48 ore.

Concentrazione	Decessi
Controllo	0/7
100 mg/L	0/7

Tab. 5: valori di pH e ossigeno disciolto dopo 48 ore di esposizione

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,61	8,44
100 mg/L	8,62	8,53

Dopodiché tutti i contenitori sono stati rimessi alle stesse condizioni per altre 24 ore di esposizione.

5° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 05/04/2021

Dopo altre 24 ore di esposizione, sono stati controllati gli organismi all'interno dei contenitori per contare gli eventuali morti (Tab. 6).

Tab. 6: numero di organismi morti per contenitore dopo 72 ore.

Concentrazione	Decessi
Controllo	0/7
100 mg/L	0/7

Tab. 7: valori di pH e ossigeno disciolto dopo 72 ore di esposizione

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,63	8,58
100 mg/L	8,57	8,72

6° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 06/04/2021

Dopo altre 24 ore di esposizione, sono stati controllati gli organismi all'interno dei contenitori per contare gli eventuali morti (Tab. 8).

Tab. 8: numero di organismi morti per contenitore dopo 96 ore.

Concentrazione	Decessi
Controllo	0/7
100 mg/L	0/7

Tab. 9: valori di pH e ossigeno disciolto dopo 96 ore di esposizione

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,62	8,73
100 mg/L	8,53	8,90

6. Calcoli

Alla concentrazione limite di 100 mg/L, il campione non induce la mortalità di alcuno dei sette Zebrafish in prova (0/7). Nel test limite non è comunque possibile calcolare la CL₅₀ (vedi anche § 7).

6.1 Criteri di validità

I criteri di validità di cui al § 7 dell'OECD 203:2019 e § 1.5 del "REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 sono rispettati.

Dopo 96 ore di esposizione:

- la mortalità nel controllo è ≤ 10% (nel test limite con 7 pesci è ammesso un solo decesso)
- i valori di pH sono rimasti approssimativamente nell'intervallo 6,0-8,5
- l'ossigeno disciolto non è mai sceso al di sotto del 60% del valore di saturazione in aria a 23°C e 1 atm (5,14 mg/L)
- la determinazione analitica della concentrazione del test non è applicabile per la matrice testata

7. Risultati

Tossicità acuta CL₅₀ > 100 mg/L

Alla concentrazione limite di 100 mg/L, il campione non induce la mortalità di alcuno dei sette Zebrafish in prova (0/7), a dimostrazione della mancanza di effetto tossico. La CL₅₀ risulta, quindi, maggiore di 100 mg/L.

8. Archivi

La presente Relazione Tecnica, il registro attività e tutti i dati grezzi prodotti durante lo studio sono archiviati presso Lab-Control s.r.l.

9. Bibliografia

1. OECD/OCDE 203:2019 – OECD guideline for testing of chemicals – Fish, Acute Toxicity Test.
2. REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 DELLA COMMISSIONE del 30 maggio 2008 (testo consolidato 2017) 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) – Allegato Parte C, metodo C.1. – Tossicità acuta per i pesci.
3. UNI EN 14735:2005 - Caratterizzazione dei rifiuti. Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche.



STUDIO DI TOSSICITÀ ACUTA IN AMBIENTE ACQUATICO CON *DAPHNIA MAGNA STRAUS* (Concentrazione limite)

Campione in prova:

RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 2 (ID campione: 202104555)

Relazione Tecnica n.:
RT 210281 rev. 00
del 08/04/2021

Committente:
NEXTECO s.r.l.
Via Dei Quartieri, n. 45
36016 Thiene (VI)

STATO DELLE REVISIONI DEL DOCUMENTO

REV.	DATA	OGGETTO DELLA REVISIONE
00	08/04/2021	EMISSIONE DOCUMENTO

PROCEDIMENTO DI APPROVAZIONE

ESECUTORE PROVE		REDATTO		APPROVATO	
FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA
RESPONSABILE REPARTO ECOTOSSICOLOGIA	Tagliati Chiara	Vice DIRETTORE TECNICO	Zecchini Fulvio	DIRETTORE TECNICO	Pasi Manuela

SOMMARIO

1. Riassunto	3
2. Obiettivo dello studio.....	3
3. Campione oggetto dello studio	3
4. Sperimentazione.....	3
4.1 Metodo di prova	3
4.2 Sostanza di riferimento	3
4.3 Riferimenti normativi	3
4.4 Apparecchiatura utilizzata	3
4.5 Reagenti e materiali	4
4.6 Preparazione del campione	4
4.7 Altri dettagli della prova	4
5. Dati grezzi	5
6. Calcoli	5
6.1 Criteri di validità.....	6
7. Risultati e conclusioni	6
8. Archivi	6
9. Bibliografia.....	6

1. Riassunto

La presente relazione tecnica riassume in modo completo tutti i dati raccolti nel corso dello studio, come la preparazione della concentrazione limite, delle condizioni di esposizione delle daphnie al campione e i risultati calcolati.

I giovani dafnidi, di età inferiore a 24 ore alla partenza della prova, sono stati esposti al campione di prova, alla concentrazione limite di 100 mg/L, per un periodo di 48 ore. L'immobilizzazione è stata registrata a 24 ore e 48 ore e confrontata con i valori ottenuti dal controllo.

2. Obiettivo dello studio

Lo scopo del presente studio è quello di calcolare se la CE_{50} (concentrazione che immobilizza il 50% degli esemplari) a 48h del campione sia superiore alla concentrazione limite di 100 mg/L. Ciò al fine di verificare se ha un effetto negativo sul crostaceo d'acqua dolce *Daphnia magna* Straus e, quindi, se presenta tossicità acuta per l'ambiente acquatico.

3. Campione oggetto dello studio

In data 17/03/2021, Lab-Control ha provveduto a prelevare presso il punto indicato dal committente il campione, denominato RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 2, e a trasportarlo in giornata al proprio laboratorio di prova, dove è stato identificato con l'ID 202104555.

Il campione, una volta ricevuto, è stato conservato sigillato, a temperatura refrigerata e al riparo dalla luce solare prima dell'esecuzione delle prove e verrà conservato nell'archivio campioni in tali condizioni per un mese dopo la fine dello studio.

4. Sperimentazione

4.1 Metodo di prova

Il seguente studio fa riferimento al metodo "OECD/OCDE 202:2004 – OECD guideline for testing of chemicals – *Daphnia sp.*, Acute Immobilisation Test" e al corrispettivo metodo del REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 del 30 maggio 2008 – Allegato Parte C, metodo C.2. Saggio di immobilizzazione acuta in *Daphnia sp.*

4.2 Sostanza di riferimento

Una sostanza di riferimento (controllo positivo) può essere testata per la CE_{50} come mezzo per assicurare che le condizioni di prova siano affidabili (§ 5, OECD 202:2004). Da metodo la CE_{50} del bicromato di potassio deve attestarsi all'interno dell'intervallo 0,6-2,1 mg/L.

4.4 Apparecchiatura utilizzata

- Scatole con pozzetti da 10 ml, ermeticamente chiuse, in plastica per evitare processi di adsorbimento o di rilascio di sostanze che possono interferire con il saggio.
- Incubatore capaci di operare alla temperatura di $20 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Lampade fluorescenti con illuminazione attenuata di circa 1500-2000 lux.
- Temporizzatore per il controllo del fotoperiodo.
- Ossimetro per la misurazione dell'ossigeno disciolto.
- pHmetro.
- Normale vetreria di laboratorio.

4.4 Reagenti e materiali

ORGANISMO TEST

Daphnia magna Straus è la specie sperimentale utilizzata (sub-allevamento come da indicazioni del metodo del lotto DM 121219, Daphtoxkit F magna, fornitore: Ecotox LDS). All'inizio della prova gli animali avevano meno di 24 ore di vita e, per ridurre la variabilità, non provenivano dalla prima nidiata e derivavano da un allevamento sano (senza segni di stress come alta mortalità, assenza di maschi e efippi, nessun ritardo nella produzione della prima nidiata, animali scoloriti assenti, ecc.). Gli animali sono stati mantenuti in condizioni di allevamento (luce, temperatura, mezzo) simili a quelle previste per la prova: la covata delle dafnie è stata mantenuta in acqua di diluizione alla temperatura di prova per almeno 48 ore prima dell'inizio del test.

ACQUA DI ALLEVAMENTO E DI DILUIZIONE

Si usa un'acqua minerale che si è dimostrata idonea durante diverse prove nel nostro laboratorio all'allevamento delle dafnie (§§ 10 e 11 OECD 202:2004). Essa possiede le seguenti caratteristiche fondamentali per l'allevamento:

- Residuo fisso a 180 °C = 181,6 mg/L
- pH = 7,61
- Conducibilità elettrica specifica a 20°C = 297,6 µS/cm

4.5 Preparazione del campione

Le concentrazioni testate sono state ottenute partendo da una soluzione madre con rapporto solido/liquido 1:10 S/L, preparata mediante lisciviazione del campione a granulometria = 4 mm con acqua di allevamento secondo la norma UNI EN 14735:2005 (EC-1-2008) "Caratterizzazione di rifiuti - Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche". La soluzione è stata messa poi ad agitare con miscelatore a rovesciamento a 10 rpm per 24 h a 23°C. L'estratto acquoso è stato lasciato sedimentare per 15 minuti. Infine, è stato filtrato su membrana 0,45 µm prima di allestire la prova.

Il controllo negativo è composto dalla sola acqua di allevamento.

4.7 Altri dettagli della prova

Gruppi test e controlli

I contenitori di prova sono stati riempiti con 10 ml di acqua di diluizione e soluzione del campione di prova; il rapporto di volume di aria/acqua nei recipienti era identico per prova e gruppi di controllo.

Le Dafnie sono state poi collocate nei recipienti di prova e, sia per la diluizione limite che per il controllo sono stati esaminati 20 animali, suddivisi in quattro gruppi di cinque animali ciascuno.

Concentrazione del test

Ai sensi del § 24 del metodo OECD 202:2004, è stata utilizzata la concentrazione limite di 100 mg/L.

Condizioni di incubazione

La temperatura è rimasta compresa a 20±1°C. È stato applicato un ciclo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. I recipienti di prova non sono stati aerati durante il test. Il test è stato effettuato senza regolazione del pH. I dafnidi non sono stati alimentati durante la prova.

Durata

La durata del test è stata di 48 ore, escluse le fasi di preparazione.

5. Dati grezzi

1° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 21/03/2021

Nel primo giorno dello studio è stato preparato l'estratto acquoso del campione come sopra descritto.

2° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 22/03/2021

A fine agitazione l'eluato è stato filtrato su filtri rapidi e poi su filtri con porosità 0,45 µm, quindi sono state realizzate le diluizioni da impiegare nelle prove.

Sono stati misurati i valori di valori di pH e di ossigeno disciolto per la diluizione preparata (Tab. 1).

Tab. 1: valori di pH e di ossigeno disciolto per la diluizione testata e per il controllo all'inizio del test.

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	7,98	9,75
100 mg/L	7,97	9,45

3° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 23/03/2021

Dopo 24 ore di esposizione, sono stati controllati gli organismi all'interno dei contenitori per contare gli eventuali immobilizzati (Tab. 2).

Tab. 2: numero di organismi immobilizzati per contenitore dopo 24 ore.

Concentrazione	1° REPLICA	2° REPLICA	3° REPLICA	4° REPLICA	TOTALE
Controllo	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20
100 mg/L	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20

Inoltre, sono stati registrati i valori di pH e di ossigeno disciolto (Tab. 3).

Tab. 3: valori di pH e di ossigeno disciolto per la concentrazione testata e per il controllo dopo 24 ore di esposizione

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,29	9,31
100 mg/L	8,32	9,35

Dopodiché tutti i contenitori sono stati rimessi alle stesse condizioni per altre 24 ore di esposizione.

4° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 24/03/2021

Dopo altre 24 ore di esposizione, sono stati controllati gli organismi all'interno dei contenitori per contare gli eventuali immobilizzati (Tab. 4).

Tab. 4: numero di organismi immobilizzati per contenitore dopo 48 ore.

Concentrazione	1° REPLICA	2° REPLICA	3° REPLICA	4° REPLICA	TOTALE
Controllo	1/5	0/5	0/5	0/5	1/20
100 mg/L	0/5	0/5	0/5	2/5	2/20

Inoltre, sono stati registrati i valori di pH e di ossigeno disciolto (Tab. 5).

Tab. 5: valori di pH e di ossigeno disciolto per la concentrazione testata e per il controllo dopo 48 ore di esposizione

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,60	8,86
100 mg/L	8,66	9,24

6. Calcoli

Nei test in concentrazione limite non è possibile calcolare il valore di CE_{50} . Alla concentrazione limite di 100 mg/L, il campione testato non induce effetti negativi rilevanti sui crostacei (immobilizzati = 2/20). Ovvero, ai sensi del § 24 "Test limite" del metodo OECD 202:2004, l'immobilizzazione non eccede il 10% degli individui totali delle repliche del campione: il valore di CE_{50} risulta, quindi, maggiore di 100 mg/L.

6.1 Criteri di validità

Il test è da considerarsi valido ai sensi del § 6, OECD 202:2004, dato che:

- nel controllo non è stata riscontrata immobilità degli organismi > 10%
- l'ossigeno disciolto alla fine del test, sia nella concentrazione testata del campione che nel controllo, è > 3 mg/L

Inoltre:

- tutti i valori di pH non sono variati più di 1,0 unità durante la prova
- controllo positivo su materiale di riferimento (MR): in un circuito nazionale di inter-calibrazione controllo positivo su materiale di riferimento (MR): nel circuito nazionale di inter-calibrazione Waste-Etox-3 organizzato da UNICHIM e conclusosi il 17/12/2020, per i valori di CE_{50} a 24h (una replica) e 48h (due repliche) di una soluzione di riferimento di bicromato di potassio sono stati trovati rispettivamente valori di Z-score pari a -1,43 e 0,00/0,74 (deve essere $-2 < Z < +2$)

7. Risultati

Tossicità acuta: $CE_{50} > 100$ mg/L

Alla concentrazione limite di 100 mg/L, il campione testato non induce effetti negativi rilevanti sui crostacei (immobilizzati = 2/20; valore accettabile per il test limite). Il valore di CE_{50} risulta, quindi, maggiore di 100 mg/L.

8. Archivi

La presente Relazione Tecnica e tutti i dati grezzi prodotti durante lo studio sono archiviati presso Lab-Control s.r.l.

9. Bibliografia

1. OECD/OCDE 202:2004 – OECD guideline for testing of chemicals – *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test
2. REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 DELLA COMMISSIONE del 30 maggio 2008 (testo consolidato 2017) 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) – Allegato Parte C, metodo C.2. Saggio di immobilizzazione acuta in *Daphnia* sp.
3. UNI EN 14735:2005 - Caratterizzazione dei rifiuti. Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche.



STUDIO DI ECOTOSSICITÀ IN AMBIENTE ACQUATICO CON *PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA* (Concentrazione limite)

Campione in prova:

RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 2 (ID campione: 202104555)

Relazione Tecnica n.:
RT 210282 rev. 00
del 09/04/2021

Committente:
NEXTECO s.r.l.
Via Dei Quartieri, n. 45
36016 Thiene (VI)

STATO DELLE REVISIONI DEL DOCUMENTO

REV.	DATA	OGGETTO DELLA REVISIONE
00	09/04/2021	EMISSIONE DOCUMENTO

PROCEDIMENTO DI APPROVAZIONE

ESECUTORE PROVE		REDATTO		APPROVATO	
FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA
RESPONSABILE REPARTO ECOTOSSICOLOGIA	Tagliati Chiara	Vice DIRETTORE TECNICO	Zecchini Fulvio	DIRETTORE TECNICO	Pasi Manuela

SOMMARIO

1. Riassunto	3
2. Obiettivo dello studio.....	3
3. Campione oggetto dello studio	3
4. Sperimentazione.....	3
4.1 Metodo di prova	3
4.2 Sostanza di riferimento	3
4.3 Apparecchiatura utilizzata	3
4.4 Reagenti.....	4
4.5 Preparazione del campione	4
4.6 Altri dettagli della prova	5
5. Dati grezzi	6
6. Calcoli	7
6.1 Analisi statistica	9
6.2 Criteri di validità.....	10
7. Risultati e conclusioni	14
8. Archivi	14
9. Bibliografia.....	14

1. Riassunto

La presente relazione tecnica riassume in modo completo tutti i dati raccolti nel corso dello studio, come la preparazione della concentrazione limite, le condizioni di esposizione delle alghe al campione e i risultati calcolati.

Le alghe, in crescita esponenziale alla partenza della prova, sono state esposte al campione di prova, alla concentrazione limite concordata col committente di 100 mg/L, per un periodo di 72 ore. La concentrazione algale è stata registrata a 24, 48 e 72 ore e confrontata con i valori ottenuti dal controllo.

2. Obiettivo dello studio

Lo scopo del presente studio è quello di determinare se il valore di CrE₅₀ (la concentrazione stimata che provoca una riduzione del 50% del tasso di crescita rispetto al controllo) del campione in prova sia maggiore della concentrazione limite testata di 100 mg/L sull'alga d'acqua dolce *Pseudokirchneriella subcapitata* (conosciuta anche come *Selenastrum capricornutum*), per valutare se questo campione possa presentare effetti di tossicità acuta per l'ambiente acquatico. Verrà valutata anche la NOEC (No Observed Effect Concentration) per stimare possibili effetti di tossicità cronica del campione.

3. Campione oggetto dello studio

In data 17/03/2021, Lab-Control ha provveduto a prelevare presso il punto indicato dal committente il campione, denominato RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 2, e a trasportarlo in giornata al proprio laboratorio di prova, dove è stato identificato con l'ID 202104555.

Il campione, una volta ricevuto, è stato conservato sigillato, a temperatura refrigerata e al riparo dalla luce solare prima dell'esecuzione delle prove e verrà conservato nell'archivio campioni in tali condizioni per un mese dopo la fine dello studio.

4. Sperimentazione

4.1 Metodo di prova

Il metodo di prova utilizzato è l'OECD 201:2006 (Annex 5 corrected 2011) "GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test".

4.2 Sostanza di riferimento

Una sostanza di riferimento (controllo positivo), es. il bicromato di potassio, può essere testata per la CrE₅₀ come mezzo per assicurare che le condizioni di prova siano affidabili (§ 12, OECD 201:2006).

4.3 Apparecchiatura utilizzata

- Celle lunghe 10 cm con capacità di 25ml, in polistirene per evitare processi di adsorbimento o di rilascio di sostanze che possono interferire con il saggio e dotate di tappo.
- Incubatore, capace di operare alla temperatura di $23 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Lampade fluorescenti che diano una illuminazione continua superiore a 6000 lux.
- pH-metro
- Autoclave
- Normale vetreria di laboratorio
- Spettrofotometro

4.4 Reagenti

ORGANISMO TEST

L'alga *Pseudokirchneriella subcapitata* è la specie sperimentale utilizzata (sub-coltivazioni secondo metodo dell'ALGALTOXKIT F lotto SC290920, fornitore: Ecotox LDS).

All'inizio della prova, la coltura si trova in fase di crescita esponenziale.

ACQUA DI COLTIVAZIONE E DI DILUIZIONE

L'acqua si prepara aggiungendo un appropriato volume di soluzione stock disciogliendo i sali in acqua distillata seguendo le quantità indicate nella tabella seguente.

Nutrienti	Concentrazione
<i>Stock solution 1: macro nutrienti</i>	
NH ₄ Cl	1.5 g/L
MgCl ₂ •6H ₂ O	1.2 g/L
CaCl ₂ •2H ₂ O	1.8 g/L
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.5 g/L
KH ₂ PO ₄	0.16 g/L
<i>Stock solution 2: ferro</i>	
FeCl ₃ •6H ₂ O	64 mg/L
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	100mg/L
<i>Stock solution 3: elementi in tracce</i>	
H ₃ BO ₃	185 mg/
MnCl ₂ •4H ₂ O	415 mg/L
ZnCl ₂	3 mg/L
CoCl ₂ •6H ₂ O	1.5mg/L
CuCl ₂ •2H ₂ O	0.01 mg/L
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	7 mg/L
<i>Stock solution 4: bicarbonato</i>	
NaHCO ₃	50 g/L

Le soluzioni stock vanno sterilizzate mediante filtrazione o mediante autoclave.

Preparazione del medium di crescita

Il medium di crescita si prepara aggiungendo a 1 litro di medium finito 10 mL della stock solution 1, 1 mL della stock solution 2, 1 mL della stock solution 3 e 1 mL della stock solution 4. Si porta a volume con acqua distillata. Prima dell'uso, si satura di ossigeno lasciandola a contatto con l'aria durante la notte, o insufflando aria per circa 30 minuti. Dopo tale operazione, se necessario, viene aggiustato il pH a 8,1±0,2 usando acido idroclorico 1 mol/L o idrossido di sodio 1 mol/L.

4.5 Preparazione del campione

Le concentrazioni testate sono state ottenute partendo da una soluzione madre con rapporto solido/liquido 1:10 S/L, preparata mediante lisciviazione del campione a granulometria = 4 mm con acqua di allevamento secondo la norma UNI EN 14735:2005 (EC-1-2008) "Caratterizzazione di rifiuti - Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche". La soluzione è stata messa poi ad agitare con miscelatore a rovesciamento a 10 rpm per 24 h a 23°C. L'estratto acquoso è stato lasciato sedimentare per 15 minuti. Infine, è stato filtrato su membrana 0,45 µm prima di allestire la prova.

Il controllo negativo è composto dalla sola acqua di coltivazione.

4.6 Altri dettagli della prova

Gruppi test e controlli

Per ottenere il medium da mettere in prova col campione sono stati utilizzati appropriati volumi dell'eluato e dell'inoculo. Per il controllo negativo l'eluato è sostituito dal solo medium di coltura delle alghe.

La densità cellulare iniziale era sufficientemente bassa da permettere una crescita esponenziale nella cultura di controllo durante la durata del test senza che il pH vari più di 1,5 unità circa.

Si preparano sei repliche per ogni concentrazione.

Si misura il pH di un campione di ogni concentrazione e del controllo.

Concentrazione del test

Ai sensi del § 42 del metodo OECD 201:2006, è stata effettuata una prova alla concentrazione limite di 100 mg/L.

Condizioni di incubazione

La temperatura di incubazione è di $23\pm 2^{\circ}\text{C}$. È stato applicato un ciclo di luce bianca continua a 6000-10000 lux. I recipienti di prova non sono stati aerati durante il test e, quest'ultimo, è stato effettuato senza regolazione del pH.

I contenitori utilizzati sono chiusi in modo da evitare contaminazioni dell'aria e ridurre l'evaporazione dell'acqua, ma non sono ermetici, pertanto permettono alla CO_2 di entrare nel contenitore.

Ogni giorno, prima della lettura, tutti i contenitori sono stati agitati e capovolti un paio di volte, in maniera tale da mantenere le cellule in sospensione e per facilitare il trasferimento della CO_2 dall'aria all'acqua e a sua volta per ridurre la variazione del pH.

Misure

È stata misurata la densità cellulare in ogni contenitore (inclusi i controlli) ogni 24 ore. La misurazione viene fatta tramite lettura della densità ottica allo spettrofotometro, usando la lunghezza d'onda impostata a 670 nm.

La densità cellulare nominale è utilizzata come densità cellulare iniziale come da metodo.

Alla fine del test, viene misurato il pH di un campione di ogni concentrazione e del controllo.

Durata

La durata del test è stata di 72 ore, escluse le fasi di preparazione.

5. Dati grezzi

1° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 25/03/2021

Nel primo giorno dello studio è stato preparato l'estratto acquoso del campione come sopra descritto.

2° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 26/03/2021

Fine agitazione dell'eluizione. L'eluato è stato filtrato su filtri rapidi e poi su filtri con porosità 0,45 µm. Ad ogni contenitore di reazione è stato aggiunto 1 mL di coltura algale.

Lettura iniziale alga per determinare la concentrazione algale di partenza per ogni contenitore: D.O. = 0,040. L'equazione del lotto di alghe utilizzato per ricavare la concentrazione algale espressa in cellule/mL viene indicata dal fornitore ed è la seguente:

$$y = 1506634x - 53184$$

Quindi la concentrazione algale di partenza è risultata essere $7,081 \times 10^3$ cellule/mL.

Sono stati misurati i valori iniziali di pH e di ossigeno disciolto (Tab. 1).

Tab. 1: valori di pH e di ossigeno disciolto per le varie diluizioni testate e per il controllo all'inizio del test

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,39	9,41
100 mg/L	8,72	9,54

3° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 27/03/2021

Dopo 24 ore di esposizione, sono stati letti i valori di assorbanza di ogni contenitore (Tab. 2).

Tab. 2: valori di assorbanza per contenitore nelle 6 repliche dopo 24 ore.

Conc.	DO 1	DO 2	DO 3	DO 4	DO 5	DO 6	Media DO
Controllo	0,075	0,073	0,071	0,070	0,070	0,079	0,073
100 mg/L	0,082	0,081	0,080	0,089	0,081	0,083	0,083

Dopodiché, tutti i contenitori sono stati rimessi alle stesse condizioni per altre 24 ore di esposizione.

4° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 28/03/2021

Dopo altre 24 ore di esposizione, sono stati letti i valori di assorbanza di ogni contenitore (Tab. 3).

Tab. 3: valori di assorbanza per contenitore nelle 6 repliche dopo 48 ore.

Conc.	DO 1	DO 2	DO 3	DO 4	DO 5	DO 6	Media DO
Controllo	0,143	0,143	0,149	0,152	0,162	0,158	0,151
100 mg/L	0,152	0,166	0,149	0,151	0,150	0,167	0,156

5° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 29/03/2021

Dopo altre 24 ore di esposizione, sono stati letti i valori di assorbanza di ogni contenitore (Tab. 4).

Tab. 4: valori di assorbanza per contenitore nelle 6 repliche dopo 72 ore.

Conc.	DO 1	DO 2	DO 3	DO 4	DO 5	DO 6	Media DO
Controllo	0,633	0,768	0,685	0,692	0,732	0,687	0,700
100 mg/L	0,689	0,664	0,662	0,670	0,665	0,668	0,670

Sono stati registrati i valori finali di pH e di ossigeno disciolto a 72h (Tab. 5).

Tab. 5: valori di pH e di ossigeno disciolto per le varie diluizioni testate e per il controllo alla fine del test

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	9,39	9,50
100 mg/L	7,90	9,50

6. Calcoli

Come primo passaggio è stata calcolata la densità cellulare, espressa in cellule/mL, per ogni valore di assorbanza letto nei tre giorni del test. A tal fine si è usata l'equazione della retta di regressione fornita dal produttore del kit, già riportata:

$$y = 1506634x - 53184$$

Una volta ottenute le concentrazioni algali, se ne calcola la media.

Tab. 6: concentrazioni algali e valori medi dopo 24h di incubazione nelle 6 repliche, espressi in cellule/mL, per il campione testato

Conc.	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Media conc.
Controllo	5,981E+04	5,680E+04	5,379E+04	5,228E+04	5,228E+04	6,584E+04	5,680E+04
100 mg/L	7,036E+04	6,885E+04	6,735E+04	8,091E+04	6,885E+04	7,187E+04	7,136E+04

Tab. 7: concentrazioni algali e valori medi dopo 48h di incubazione nelle 6 repliche, espressi in cellule/mL, per il campione testato

Conc.	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Media conc.
Controllo	1,623E+05	1,623E+05	1,713E+05	1,758E+05	1,909E+05	1,849E+05	1,746E+05
100 mg/L	1,758E+05	1,969E+05	1,713E+05	1,743E+05	1,728E+05	1,984E+05	1,816E+05

Tab. 8: concentrazioni algali e valori medi dopo 72h di incubazione nelle 6 repliche, espressi in cellule/mL, per il campione testato

Conc.	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Media conc.
Controllo	9,005E+05	1,104E+06	9,789E+05	9,894E+05	1,050E+06	9,819E+05	1,001E+06
100 mg/L	9,849E+05	9,472E+05	9,442E+05	9,563E+05	9,487E+05	9,532E+05	9,558E+05

Ponendo in un grafico di dispersione le misure di logaritmo naturale (ln) della densità cellulare (cellule/mL) rispetto alla concentrazione del campione testato e al tempo di misurazione, si sono tracciate le curve di crescita per la concentrazione limite e per il controllo. Una curva lineare indica che la crescita è esponenziale, mentre un livellamento indica che le colture sono entrate in fase stazionaria.

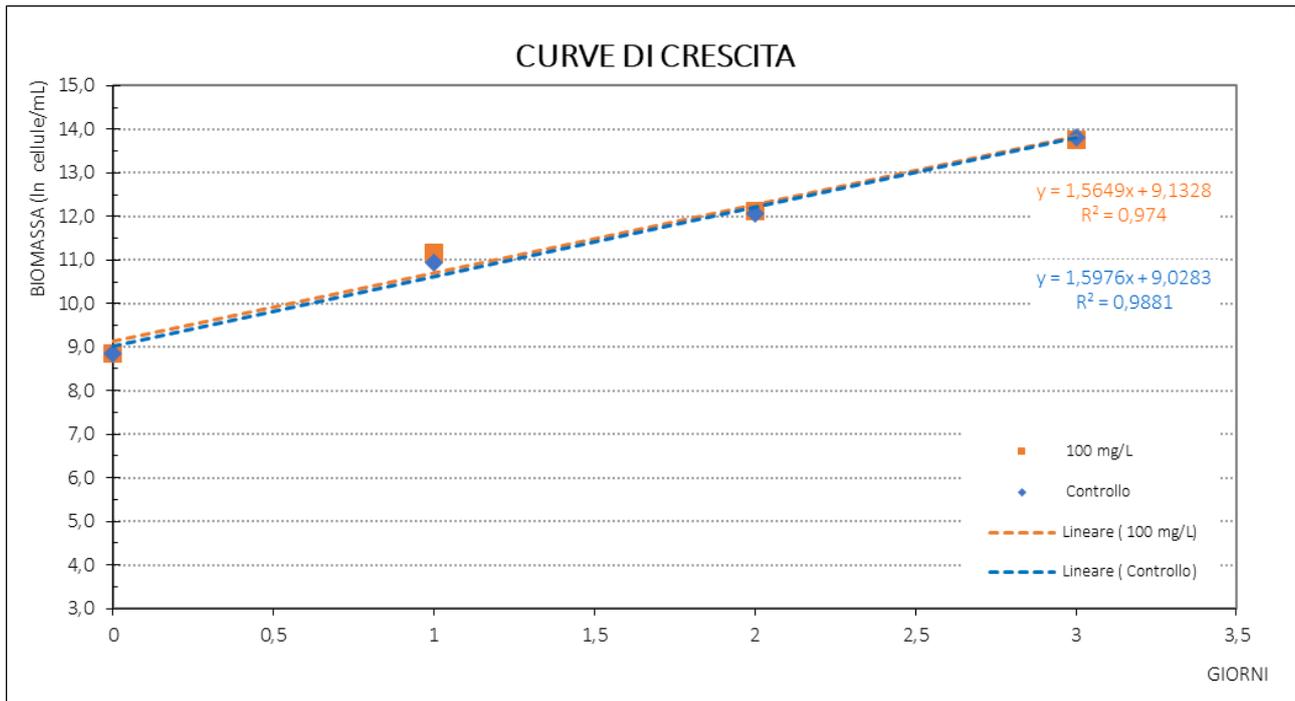


Fig. 1: curve di crescita algale a 72h della concentrazione limite e del controllo negativo. Biomassa in scala logaritmica (ln). La pendenza della retta rappresenta il tasso specifico di crescita (§44, OECD 201:2006).

Dopodiché si è calcolato il tasso di crescita specifico medio giornaliero, μ , per ogni coltura test, usando la seguente equazione:

$$\mu = \frac{\ln x_L - \ln x_0}{t_L - t_0}$$

Dove:

t_0 è il tempo di inizio del test

t_L è il tempo di fine del test (o il tempo dell'ultima misurazione durante il periodo di crescita esponenziale nelle colture di controllo)

x_0 è la densità cellulare nominale iniziale

x_L è la densità cellulare misurata al tempo t_L

Tab.9: tassi di crescita specifici del controllo e del campione per replica e per giorno

	Replica	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5	Rep. 6	Media	CV	CV%	%I _r
$\mu_{i,j}$ 0-1	Controllo	2,13	2,08	2,03	2,00	2,00	2,23	2,08	0,091	4,4	-11,1
	100 mg/L	2,30	2,27	2,25	2,44	2,27	2,32	2,31	0,066	2,9	
$\mu_{i,j}$ 1-2	Controllo	1,00	1,05	1,16	1,21	1,30	1,03	1,12	0,117	10,4	16,9
	100 mg/L	0,92	1,05	0,93	0,77	0,92	1,02	0,93	0,099	10,5	
$\mu_{i,j}$ 2-3	Controllo	1,71	1,92	1,74	1,73	1,70	1,67	1,75	0,087	5,0	4,8
	100 mg/L	1,72	1,57	1,71	1,70	1,70	1,57	1,66	0,072	4,3	
$\mu_{i,j}$ medio	Controllo							1,65	0,016	1,0	

%I_r = percentuale di inibizione del tasso di riproduzione medio giornaliero

Confrontando i valori del tasso medio di crescita a 72h del bianco e delle concentrazioni testate, si può calcolare l'inibizione percentuale del tasso di crescita %I_r con la formula di cui al § 50 del metodo OECD 201:2006 (Tab. 10):

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

Dove:

%I_r è la percentuale di inibizione della media del tasso di crescita specifico

μ_C è il valore medio del tasso di crescita specifico medio del gruppo di controllo

μ_T è la media del tasso di crescita specifico della replica del trattamento T

Tab.10: tassi di crescita specifici per concentrazione a 72h nelle 6 repliche

Tasso di crescita giornaliero medio a 72h (ln cellule/mL/giorno)								
Replica	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5	Rep. 6	Media	%I _r
Controllo*	1,615	1,683	1,643	1,647	1,666	1,644	1,650	---
100 mg/L	1,645	1,632	1,631	1,635	1,633	1,634	1,635	0,89%

*: fattore di crescita biomassa controllo = **141,32**

6.1 Analisi statistica

Si riporta di seguito l'analisi statistica (Tab. 11) per il confronto del tasso di crescita del controllo e della concentrazione limite del campione. I dati utilizzati per i valori di tasso di crescita nell'analisi statistica sono quelli della Tab. 10. Per l'analisi della normalità delle serie di dati dei replicati si è utilizzato il test di Shapiro-Wilk, con controllo dei dati anomali mediante test di Huber. Sia le serie di dati del campione che quella del controllo sono risultate distribuite normalmente e non sono stati trovati dati anomali.

Tab.11: confronto statistico tra tasso di crescita del controllo e della concentrazione limite a 72h nelle 6 repliche

Tasso di crescita			Test F a due campioni per varianze																																			
Replica	Controllo	100 mg/L																																				
Rep. 1	1,615	1,645																																				
Rep. 2	1,683	1,632																																				
Rep. 3	1,643	1,631																																				
Rep. 4	1,647	1,635																																				
Rep. 5	1,666	1,633																																				
Rep. 6	1,644	1,634																																				
Media	1,650	1,635																																				
%I _r = 0,89%			<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Controllo</th> <th>100 mg/L</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Media</td> <td>1,6496653</td> <td>1,6349798</td> </tr> <tr> <td>Varianza</td> <td>0,0005333</td> <td>2,647E-05</td> </tr> <tr> <td>Osservazioni</td> <td>6</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>gdl</td> <td>5</td> <td>5</td> </tr> <tr> <td>F</td> <td>20,14469</td> <td></td> </tr> <tr> <td>P(F<=f) una coda</td> <td>0,0025097</td> <td></td> </tr> <tr> <td>F critico una coda</td> <td>5,0503291</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>				Controllo	100 mg/L	Media	1,6496653	1,6349798	Varianza	0,0005333	2,647E-05	Osservazioni	6	6	gdl	5	5	F	20,14469		P(F<=f) una coda	0,0025097		F critico una coda	5,0503291										
	Controllo	100 mg/L																																				
Media	1,6496653	1,6349798																																				
Varianza	0,0005333	2,647E-05																																				
Osservazioni	6	6																																				
gdl	5	5																																				
F	20,14469																																					
P(F<=f) una coda	0,0025097																																					
F critico una coda	5,0503291																																					
Test t: due campioni assumendo varianze diverse																																						
			<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Controllo</th> <th>100 mg/L</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Media</td> <td>1,6496653</td> <td>1,6349798</td> </tr> <tr> <td>Varianza</td> <td>0,0005333</td> <td>2,647E-05</td> </tr> <tr> <td>Osservazioni</td> <td>6</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>Differenza ipotizzata per le medie</td> <td>0</td> <td></td> </tr> <tr> <td>gdl</td> <td>5</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Stat t</td> <td>1,5204095</td> <td></td> </tr> <tr> <td>P(T<=t) una coda</td> <td>0,0944425</td> <td></td> </tr> <tr> <td>t critico una coda</td> <td>2,0150484</td> <td></td> </tr> <tr> <td>P(T<=t) due code</td> <td>0,188885</td> <td></td> </tr> <tr> <td>t critico due code</td> <td>2,5705818</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>				Controllo	100 mg/L	Media	1,6496653	1,6349798	Varianza	0,0005333	2,647E-05	Osservazioni	6	6	Differenza ipotizzata per le medie	0		gdl	5		Stat t	1,5204095		P(T<=t) una coda	0,0944425		t critico una coda	2,0150484		P(T<=t) due code	0,188885		t critico due code	2,5705818	
	Controllo	100 mg/L																																				
Media	1,6496653	1,6349798																																				
Varianza	0,0005333	2,647E-05																																				
Osservazioni	6	6																																				
Differenza ipotizzata per le medie	0																																					
gdl	5																																					
Stat t	1,5204095																																					
P(T<=t) una coda	0,0944425																																					
t critico una coda	2,0150484																																					
P(T<=t) due code	0,188885																																					
t critico due code	2,5705818																																					

Per verificare se siamo in presenza di due serie con uguale varianza o meno, è stato usato l'apposito test F. Col test t sono state confrontate le medie del tasso di crescita nel campione a 100 mg/L e nel controllo negativo, a 72h. A seguito dei test risulta che, alla concentrazione limite testata di 100 mg/L, non vi è una differenza statisticamente significativa del tasso di crescita medio di *Pseudokirchneriella subcapitata* tra controllo e campione. Pertanto, avremo CrE₅₀ > 100 mg/L e NOEC > 100 mg/L.

6.2 Criteri di validità

Il test è da considerarsi valido, dato che:

- La biomassa del controllo a 72h rispetto all'inizio del test è risultata essere cresciuta di un fattore maggiore del 16 richiesto dal metodo (p.to 11 OECD 201:2006)
- il coefficiente medio di variazione section-by-section del tasso di crescita specifico nel controllo non eccede il 35% (p.to 11 della OECD 201:2006)
- il coefficiente di variazione del tasso di crescita medio del controllo durante l'intero test è inferiore al 7% (p.to 11 della OECD 201:2006)
- La CrE₅₀ a 72h della sostanza di riferimento bicromato di potassio (K₂Cr₂O₇) è accettabile (vedi Box 1)

BOX 1 CrE₅₀ della sostanza di riferimento: bicromato di potassio (K₂Cr₂O₇)

Tab. B1: valori di assorbanza (o densità ottica, DO) per la sostanza di riferimento dopo 24 ore nelle 3 repliche

Conc.	DO 1	DO 2	DO 3	Media DO
Controllo	0.090	0.100	0.108	0.099
0,18 mg/L	0.089	0.107	0.083	0.093
0,32 mg/L	0.087	0.083	0.084	0.085
0,56 mg/L	0.083	0.078	0.094	0.085
1,00 mg/L	0.076	0.069	0.069	0.071
1,80 mg/L	0.079	0.083	0.071	0.078

Tab. B2: valori di assorbanza (o densità ottica, DO) per la sostanza di riferimento dopo 48 ore nelle 3 repliche

Conc.	DO 1	DO 2	DO 3	Media DO
Controllo	0.322	0.350	0.375	0.349
0,18 mg/L	0.334	0.373	0.322	0.343
0,32 mg/L	0.374	0.334	0.357	0.355
0,56 mg/L	0.253	0.235	0.287	0.258
1,00 mg/L	0.091	0.092	0.084	0.089
1,80 mg/L	0.046	0.046	0.040	0.044

Tab. B2: valori di assorbanza (o densità ottica, DO) per la sostanza di riferimento dopo 72 ore nelle 3 repliche

Conc.	DO 1	DO 2	DO 3	Media DO
Controllo	0.322	0.350	0.375	0.349
0,18 mg/L	0.334	0.373	0.322	0.343
0,32 mg/L	0.374	0.334	0.357	0.355
0,56 mg/L	0.253	0.235	0.287	0.258
1,00 mg/L	0.091	0.092	0.084	0.089
1,80 mg/L	0.046	0.046	0.040	0.044

Lettura iniziale alga per determinare la concentrazione algale di partenza per ogni contenitore: D.O. = 0,040. L'equazione del lotto di alghe utilizzato (Algatokit Ecotox lotto SC260618) per ricavare la concentrazione algale espressa in cellule/ml viene indicata dal fornitore ed è la seguente:

$$y = 1325476x - 47874$$

Tab. B4: concentrazioni algali e valori medi nelle 3 repliche dopo 24h di incubazione, espressi in cells/mL

Conc.	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Media conc.
Controllo	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03
0,18 mg/L	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03
0,32 mg/L	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03
0,56 mg/L	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03
1,00 mg/L	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03
1,80 mg/L	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03

Tab. B5: concentrazioni algali e valori medi nelle 3 repliche dopo 48h di incubazione, espressi in cells/mL

Conc.	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Media conc.
Controllo	7.142E+04	8.467E+04	9.528E+04	8.379E+04
0,18 mg/L	7.009E+04	9.395E+04	6.214E+04	7.540E+04
0,32 mg/L	6.744E+04	6.214E+04	6.347E+04	6.435E+04
0,56 mg/L	6.214E+04	5.551E+04	7.672E+04	6.479E+04
1,00 mg/L	5.286E+04	4.358E+04	4.358E+04	4.668E+04
1,80 mg/L	5.684E+04	6.214E+04	4.623E+04	5.507E+04

Tab. B6: concentrazioni algali e valori medi nelle 3 repliche dopo 72h di incubazione, espressi in cells/mL

Conc.	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Media conc.
Controllo	3.789E+05	4.160E+05	4.492E+05	4.147E+05
0,18 mg/L	3.948E+05	4.465E+05	3.789E+05	4.068E+05
0,32 mg/L	4.479E+05	3.948E+05	4.253E+05	4.227E+05
0,56 mg/L	2.875E+05	2.636E+05	3.325E+05	2.945E+05
1,00 mg/L	7.274E+04	7.407E+04	6.347E+04	7.009E+04
1,80 mg/L	1.310E+04	1.310E+04	5.145E+03	1.045E+04

Sono state tabulate le misure di densità cellulare rispetto alla concentrazione del campione testato e al tempo di misurazione. È stata tracciata una curva per ogni concentrazione test e per il controllo, come un grafico della media della densità cellulare contro il tempo. Una curva di crescita lineare indica una crescita esponenziale, mentre un livellamento indica che le colture sono entrate in fase stazionaria.

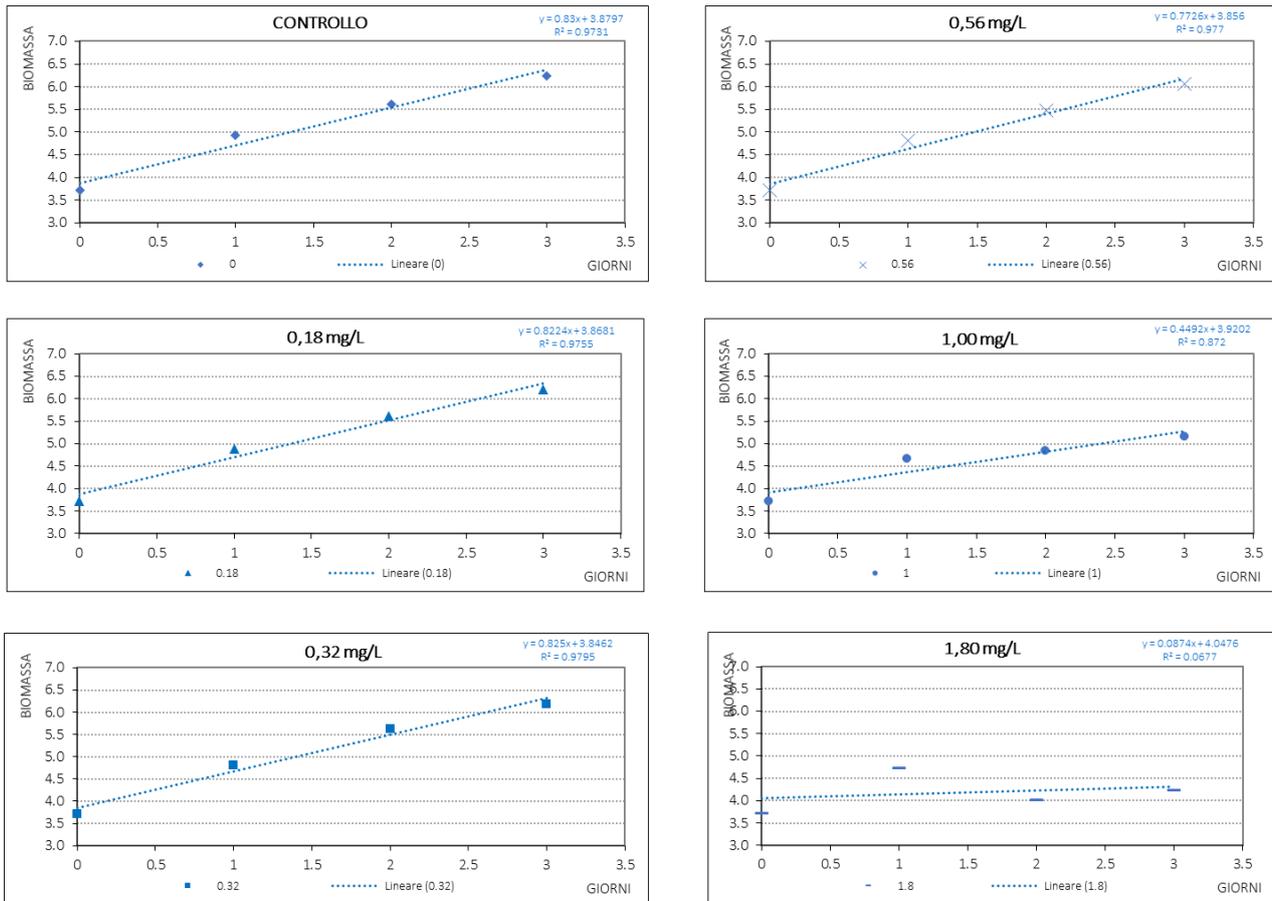


Fig. B1: curve di crescita algale alle varie concentrazioni testate del bicromato di potassio

Dopodiché si è calcolato il tasso di crescita specifico medio, μ , per ogni coltura test, usando la seguente equazione:

$$\mu = \frac{\ln x_L - \ln x_0}{t_L - t_0}$$

Dove:

t_0 è il tempo di inizio del test

t_L è il tempo di fine del test (o il tempo dell'ultima misurazione durante il periodo di crescita esponenziale nelle colture di controllo)

x_0 è la densità cellulare nominale iniziale

x_L è la densità cellulare misurata al tempo t_L

È stato calcolato poi il valore medio di μ per ogni replica dei gruppi test e del controllo. Da questi valori, è stata calcolata la percentuale di inibizione per ogni replica dei gruppi test, tramite la seguente equazione:

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100$$

Dove:

$I_{\mu i}$ è la percentuale di inibizione (tasso di crescita) per la concentrazione test i ;

μ_i è il tasso di crescita medio per la concentrazione test i ;

μ_c è il tasso di crescita medio per il controllo.

Tab. B7: tassi crescita specifica e % inibizione alle varie diluizioni della sostanza di riferimento

Tasso a 72h	Conc.	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Tasso medio	CV	CV%	%I _r
μ _j 0-3	Controllo	5.78	5.85	5.88	5.84	0.050	0.86	0.0
	0,18 mg/L	5.74	5.79	5.72	5.75	0.034	0.60	1.5
	0,32 mg/L	5.71	5.69	5.72	5.70	0.014	0.24	2.3
	0,56 mg/L	5.41	5.34	5.51	5.42	0.089	1.63	7.1
	1,00 mg/L	3.39	3.32	3.22	3.31	0.086	2.60	43.3
	1,80 mg/L	1.27	1.12	1.27	1.22	0.090	7.35	79.1

Infine, è stato realizzato il grafico dose inibizione. Mediante regressione logaritmica è stato trovato il valore di CrE₅₀ = **1,12 mg/L** in corrispondenza col valore %I_r = 50%, con intervallo di confidenza al 95% pari a **1,07-1,18 mg/L**. In base ai risultati del circuito inter-laboratorio a cui questi dati si riferiscono, il valore di accettabilità per la CrE₅₀ è 0,32-1,48 mg/L.

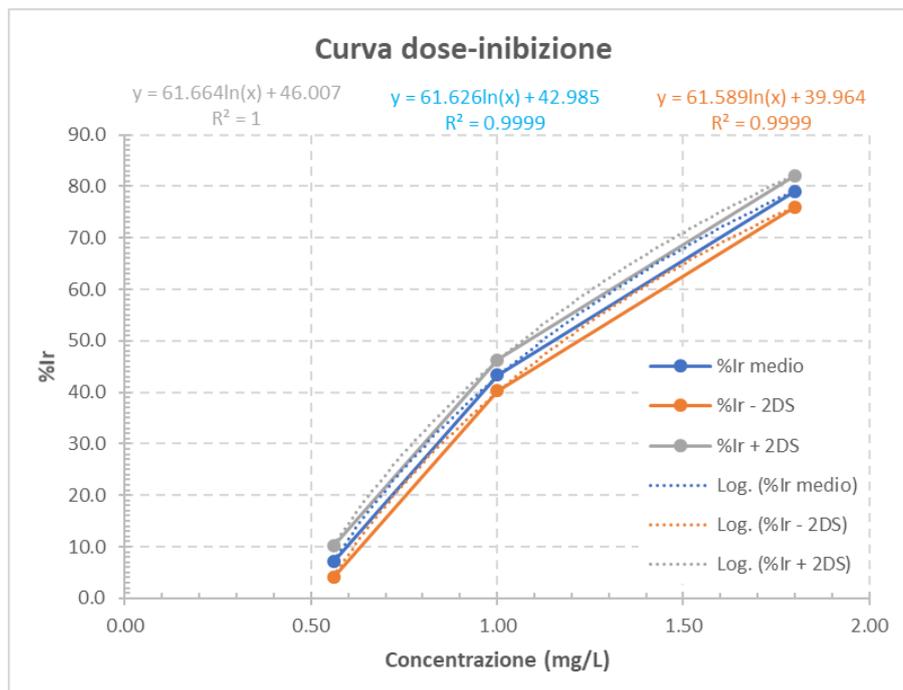


Fig. B2: curva dose-inibizione per il bicromato di potassio

7. Risultati e conclusioni

Tossicità acuta: CrE₅₀ > 100 mg/L

Dopo 72h di crescita alla concentrazione limite di 100 mg/L, il campione testato non ha influenza significativa sul tasso di crescita delle alghe rispetto al controllo. Pertanto, possiamo affermare che la CrE₅₀ a 72h (concentrazione alla quale avremo %I_r ≥ 50%) sarà maggiore di 100 mg/L.

Tossicità cronica: NOEC > 100 mg/L

Poiché la concentrazione limite testata non ha effetto statisticamente significativo, possiamo considerare che anche la NOEC (No Observed Effect Concentration) sia maggiore di 100 mg/L.

8. Archivi

La presente Relazione Tecnica e tutti i dati grezzi prodotti durante lo studio sono archiviati presso Lab-Control s.r.l.

9. Bibliografia

1. OECD/OCDE 201:2011 - OECD guideline for testing of chemicals – Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.
2. UNI EN ISO 8692:2005 - Prova di inibizione della crescita di alghe di acqua dolce per mezzo di alghe verdi unicellulari.
3. REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 DELLA COMMISSIONE del 30 maggio 2008 (testo consolidato 2017) 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) – Allegato Parte C, metodo C.3. Saggio di inibizione della crescita delle alghe.
4. UNI EN 14735:2005 - Caratterizzazione dei rifiuti. Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche.



STUDIO DI TOSSICITÀ CRONICA IN AMBIENTE ACQUATICO CON *DAPHNIA MAGNA STRAUS* (Concentrazione limite)

Campione in prova:

RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 2 (ID campione: 202104555)

Relazione Tecnica n.:

RT 210283 rev. 00
del 09/04/2021

Committente:

NEXTECO s.r.l.
Via Dei Quartieri, n. 45
36016 Thiene (VI)

STATO DELLE REVISIONI DEL DOCUMENTO

REV.	DATA	OGGETTO DELLA REVISIONE
00	09/04/2021	EMISSIONE DOCUMENTO

PROCEDIMENTO DI APPROVAZIONE

ESECUTORE PROVE		REDATTO		APPROVATO	
FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA
RESPONSABILE REPARTO ECOTOSSICOLOGIA	Tagliati Chiara	Vice DIRETTORE TECNICO	Zecchini Fulvio	DIRETTORE TECNICO	Pasi Manuela

Sommario

1. Riassunto	3
2. Obiettivo dello studio.....	3
3. Campione oggetto dello studio	3
4. Sperimentazione.....	3
4.1 Metodo di prova	3
4.2 Apparecchiatura utilizzata.....	3
4.3 Reagenti.....	4
4.4 Preparazione.....	4
4.5 Metodo di prova	4
5. Dati grezzi	5
6. Risultati.....	6
6.1 Analisi statistica dei dati	6
6.2 Criteri di validità della prova.....	7
7. Conclusioni	7
8. Archivi	7
9. Bibliografia.....	7

1. Riassunto

La presente Relazione Tecnica riassume in modo completo tutti i dati raccolti nel corso dello studio.

I giovani dafnidi, di età inferiore a 24 ore alla partenza della prova, sono esposti al campione di prova a concentrazione limite di 1 mg/L in 10 repliche con un singolo individuo progenitore, per 21 giorni. A intervalli regolari viene controllata la produzione di prole dei singoli progenitori e la mortalità nei vari contenitori. I valori ritrovati nei contenitori con il campione in prova vengono poi confrontati statisticamente col bianco rappresentato dal solo medium di allevamento.

2. Obiettivo dello studio

Lo scopo del presente studio in concentrazione limite è stato quello di valutare la tossicità cronica sul crostaceo d'acqua dolce *Daphnia magna* Straus, ovvero se il valore della NOEC (No Observed Effect Concentration) del campione in prova è superiore alla concentrazione limite (§ 36, OECD 211:2012) testata di 1 mg/L.

3. Campione oggetto dello studio

In data 17/03/2021, Lab-Control ha provveduto a prelevare presso il punto indicato dal committente il campione, denominato RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 2, e a trasportarlo in giornata al proprio laboratorio di prova, dove è stato identificato con l'ID 202104555.

Il campione, una volta ricevuto, è stato conservato sigillato, a temperatura refrigerata e al riparo dalla luce solare prima dell'esecuzione delle prove e verrà conservato nell'archivio campioni in tali condizioni per un mese dopo la fine dello studio.

4. Sperimentazione

4.1 Metodo di prova

Il presente studio fa riferimento al metodo "OECD/OCDE 211:2012 – OECD guideline for testing of chemicals – *Daphnia magna* Reproduction Test", riportato anche nel REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 metodo C.20. Prova di riproduzione con *Daphnia magna*.

4.2 Apparecchiatura utilizzata

- Piastre con pozzetti da 10 mL, con coperchio, in plastica per evitare processi di adsorbimento o di rilascio di sostanze che possono interferire con il saggio.
- Incubatore capaci di operare alla temperatura di $20 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Lampade fluorescenti con illuminazione attenuata di circa 1500-2000 lux.
- Temporizzatore per il controllo del fotoperiodo.
- Ossimetro per la misurazione dell'ossigeno disciolto.
- pHmetro
- Normale vetreria di laboratorio.

4.3 Reagenti

Organismo test

Daphnia magna Straus è la specie sperimentale utilizzata (sub-allevamento come da indicazioni del metodo del lotto DM 121219, Daphtokit F magna, fornitore: Ecotox LDS). All'inizio della prova gli animali avevano meno di 24 ore di vita e, per ridurre la variabilità, non provenivano dalla prima nidiata e derivavano da un allevamento sano (senza segni di stress come alta mortalità, assenza di maschi e efippi, nessun ritardo nella produzione della prima nidiata, animali scoloriti assenti, ecc.). Gli animali sono stati mantenuti in condizioni di allevamento (luce, temperatura, mezzo) simili a quelle previste per la prova: la covata delle dafnie è stata mantenuta in acqua di diluizione alla temperatura di prova per almeno 48 ore prima dell'inizio del test.

Acqua di allevamento e di diluizione

Si usa un'acqua minerale che si è dimostrata idonea durante diverse prove nel nostro laboratorio all'allevamento delle dafnie (§§ 10 e 11 OECD 202:2004). Essa possiede le seguenti caratteristiche fondamentali per l'allevamento:

- Residuo fisso a 180 °C = 181,6 mg/L
- pH = 7,61
- Conducibilità elettrica specifica a 20°C = 297,6 µS/cm

4.4 Preparazione

Le concentrazioni testate sono state ottenute partendo da una soluzione madre con rapporto solido/liquido 1:10 S/L, preparata mediante lisciviazione del campione a granulometria = 4 mm con acqua di coltivazione secondo la norma UNI EN 14735:2005 (EC-1-2008) "Caratterizzazione di rifiuti - Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche". La soluzione è stata messa poi ad agitare con miscelatore a rovesciamento a 10 rpm per 24 h a 23°C. L'estratto acquoso è stato lasciato sedimentare per 15 minuti. Infine, è stato filtrato su membrana 0,45 µm prima di allestire la prova.

Il controllo negativo è composto dalla sola acqua di coltivazione.

4.5 Metodo di prova

Gruppi test e controlli

I contenitori di prova sono stati riempiti con 50 ml di acqua di diluizione e soluzioni del campione di prova; il rapporto di volume di aria/acqua nei recipienti è identico per prova e gruppi di controllo. Le dafnie sono state poi collocate nei recipienti di prova. Sono stati utilizzati, per ogni concentrazione e per i controlli, 10 animali, ciascuno in un suo contenitore.

Concentrazione del test

Ai sensi del § 36 dell'OECD 211:2012, il test è stato condotto alla concentrazione limite di 1 mg/L.

Condizioni di incubazione

La temperatura è rimasta nell'intervallo 20±1°C. È stato applicato un ciclo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. I recipienti di prova non sono stati aerati durante il test. Il test è stato effettuato senza regolazione del pH. I dafnidi sono stati alimentati giornalmente durante la prova con l'alga *Scenedesmus dimorphus* in quantità pari a 0.1 - 0.2 mg C/dafnia/giorno. Il medium di allevamento è stato cambiato ogni 2 giorni. Il pH nelle varie repliche si è mantenuto nell'intorno dell'intervallo di accettabilità da metodo (pH = 6-9), così come la concentrazione di ossigeno che deve essere > 3 mg/L.

Durata

La durata del test è stata di 21 giorni, dal 19/03/2021 al 09/04/2021, escluse le fasi di preparazione.

5. Dati grezzi

I dati grezzi sono riportati nelle due tabelle seguenti.

Tab. 1. Dati di riproduzione del controllo negativo (bianco)

Replica bianco	19/03/2021	22/03/2021	24/03/2021	26/03/2021	29/03/2021	31/03/2021	02/04/2021	06/04/2021	09/04/2021	Somma	Media	DS
1	0	0	0	0	31	52	23	40	53	199	39,8	22,9
2	0	0	0	0	32	37	0	60	2	131	26,2	22,6
3	0	0	0	0	36	51	0	42	44	173	34,6	23,1
4	0	0	0	0	21	52	32	16	45	166	33,2	20,6
5	0	0	0	23	41	0	44	55	35	198	39,6	22,5
6	0	0	0	0	30	43	0	76	0	149	29,8	27,5
7	0	0	0	0	24	33	0	63	5	125	25,0	22,1
8	0	0	0	0	45	0	43	44	35	167	33,4	22,2
9	0	0	0	0	31	43	0	58	0	132	26,4	23,0
10	0	0	0	0	37	0	25	3	0	65	13,0	13,8
Somma	0	0	0	23	328	311	167	457	219	1505	301	
Media	0,0	0,0	0,0	2,3	32,8	31,1	16,7	45,7	21,9	150,5	30,1	
DS	0,0	0,0	0,0	7,3	7,3	22,3	18,8	22,1	22,2			

Tab. 2. Dati di riproduzione del campione in concentrazione limite 1 mg/L.

Replica campione	19/03/2021	22/03/2021	24/03/2021	26/03/2021	29/03/2021	31/03/2021	02/04/2021	06/04/2021	09/04/2021	Somma	Media	DS
1	0	0	0	0	29	35	0	81	0	145	29,0	28,0
2	0	0	0	0	26	33	6	66	23	154	30,8	22,5
3	0	0	0	0	36	48	0	58	50	192	38,4	25,9
4	0	0	0	0	26	40	34	38	46	184	36,8	20,1
5	0	0	0	0	25	45	37	30	51	188	37,6	21,2
6	0	0	0	0	29	53	31	39	74	226	45,2	27,2
7	0	0	0	0	26	34	20	29	53	162	32,4	19,3
8	0	0	0	0	36	21	48	35	52	192	38,4	22,0
9	0	0	0	0	26	56	31	32	77	222	44,4	28,0
10	0	0	0	0	14	29	44	34	58	179	35,8	22,2
Somma	0	0	0	0	273	394	251	442	484	1844	368,8	
Media	0	0	0	0,0	27,3	39,4	25,1	44,2	48,4	184,4	36,9	
DS	0,0	0,0	0,0	0,0	6,2	11,1	17,7	17,8	22,6			

6. Risultati

6.1 Analisi statistica dei dati

Per l'analisi della normalità delle serie di dati delle medie di prole dei 10 replicati si è utilizzato il test di Shapiro-Wilk, con verifica di eventuali dati anomali mediante test di Huber, in caso di serie non normali. Sia le serie di dati del campione che quella del controllo sono risultate distribuite normalmente.

Per verificare se vi è un effetto alla concentrazione limite, la media di prole del campione è stata confrontata con quella del bianco attraverso i test statistici (§ 58; OECD 211:2012) di cui seguono i risultati.

Tab. 3: confronto statistico tra numerosità della prole del controllo e della concentrazione limite a fine test

Replica	Media bianco	Media campione
1	39,8	29,0
2	26,2	30,8
3	34,6	38,4
4	33,2	36,8
5	39,6	37,6
6	29,8	45,2
7	25,0	32,4
8	33,4	38,4
9	26,4	44,4
10	13,0	35,8
Media	30,1	36,9

Test F a due campioni per varianze		
	Media bianco	Media campione
Media	30,1	36,88
Varianza	63,61111111	27,91288889
Osservazioni	10	10
gdl	9	9
F	2,278915356	
P(F<=f) una coda	0,117835618	
F critico una coda	3,178893104	

Test t: due campioni assumendo uguale varianza		
	Media bianco	Media campione
Media	30,1	36,88
Varianza	63,61111111	27,91288889
Osservazioni	10	10
Varianza complessiva	45,762	
Differenza ipotizzata per le medie	0	
gdl	18	
Stat t	-2,241104965	
P(T<=t) una coda	0,018932628	
t critico una coda	1,734063607	
P(T<=t) due code	0,037865256	
t critico due code	2,10092204	

Per verificare se siamo in presenza di due serie con uguale varianza o meno, è stato usato l'apposito test F. Tramite Test t sono state confrontate le medie di prole nel campione a 1 mg/L e nel controllo negativo (bianco).

A seguito dei test statistici, risulta che non vi è differenza significativa tra le medie della dose testata e del controllo. Possiamo, quindi, affermare che alla concentrazione limite di 1 mg/L il campione non ha influenza sulla riproduzione di *Daphnia magna* Straus, ovvero avremo $CE_{50} > 1$ mg/L e $NOEC > 1$ mg/L.

6.2 Criteri di validità della prova

Nel test sono rispettati i parametri di validazione del test:

- per controllo e campione: mortalità dei progenitori $\leq 20\%$ alla fine del test;
- per il controllo: media dei figli prodotti per ciascun animale sopravvissuto alla fine del test ≥ 60 .

Sono inoltre rispettate tutte le condizioni ambientali richieste durante il test (temperatura, pH, concentrazione di O₂ ecc., Tab. 4).

Tab. 4: valori di pH e di ossigeno disciolto per le varie diluizioni testate e per il controllo all'inizio (t_0) e alla fine (t_{21}) del test

Concentrazione	pH _{t₀}	[O ₂] _{t₀} (mg/L)	pH _{t₂₁}	[O ₂] _{t₂₁} (mg/L)
Controllo	8,03	9,94	8,17	8,45
1 mg/L	7,88	9,93	8,47	9,16

7. Conclusioni

Tossicità cronica NOEC > 1 mg/L

Alla concentrazione limite di 1 mg/L il campione non ha effetto statisticamente significativo sulla riproduzione di *Daphnia magna* Straus. La NOEC (No Observed Effect Concentration) sarà quindi maggiore di 1 mg/L.

8. Archivi

La presente Relazione Tecnica e tutti i dati grezzi prodotti durante lo studio sono archiviati presso Lab-Control s.r.l.

9. Bibliografia

1. OECD/OCDE 211:2012 – OECD guideline for testing of chemicals – *Daphnia magna* Reproduction Test
2. REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 DELLA COMMISSIONE del 30 maggio 2008 (testo consolidato 2019) 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). Allegato C, C.20. Prova di riproduzione con *Daphnia magna*
3. UNI EN 14735:2005 (EC-1-2008) "Caratterizzazione di rifiuti - Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche"



PROVA SULLE PIANTE TERRESTRI: EMERGENZA E CRESCITA DELLE PLANTULE (OECD 208:2006)

Campione in prova:
RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 2
 (Campione ID 202104555)

Relazione tecnica n.:
RT 201284 rev. 00
 del 07/04/2021

Committente:
NEXTECO s.r.l.
Via Dei Quartieri, n. 45
36016 Thiene (VI)

STATO DELLE REVISIONI DEL DOCUMENTO

REV.	DATA	OGGETTO DELLA REVISIONE
00	07/04/2021	EMISSIONE DOCUMENTO

PROCEDIMENTO DI APPROVAZIONE

ESECUTORE PROVE		REDDATTO		APPROVATO	
FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA
RESPONSABILE REPARTO ECOTOSSICOLOGIA	Tagliati Chiara	Vice DIRETTORE TECNICO	Zecchini Fulvio	DIRETTORE TECNICO	Pasi Manuela

Sommario

1. Riassunto	3
2. Obiettivo dello studio	3
3. Campione oggetto dello studio	3
4. Sperimentazione.....	3
4.1 Preparazione del campione.....	3
4.2 Condizioni di esecuzione	4
4.3 Validità del test.....	4
4.4 Strumentazione	4
4.5 Reagenti e materiali.....	4
5. Dati grezzi e calcoli	5
6. Risultati	6
7. Archivi	7
8. Bibliografia.....	7

1. Riassunto

La presente relazione tecnica riassume in modo completo tutti i dati raccolti nel corso dello studio, come la preparazione del campione prima del test, le condizioni di esposizione delle piante scelte e i risultati calcolati.

2. Obiettivo dello studio

La prova di fitotossicità sulle piante è stata eseguita secondo il metodo OECD 208:2006 "OECD Guidelines for the Testing of Chemicals - Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test", ripreso dal metodo C.31 "Prova sulle piante terrestri: emergenza delle plantule e crescita delle plantule" del Reg. CE 440/2008.

La presente prova di fitotossicità valuta gli effetti dell'esposizione alla sostanza chimica in esame contenuta nel terreno (o in un'altra matrice del suolo appropriata) sull'emergenza delle plantule e sulle fasi iniziali di crescita delle piante superiori. I semi sono messi a contatto con il terreno trattato con la sostanza chimica in esame, i cui effetti sono valutati generalmente 14-21 giorni dopo l'emergenza del 50% delle plantule nel gruppo di controllo. Gli endpoint misurati sono la valutazione visiva dell'emergenza delle plantule, il peso dei germogli secchi (in alternativa, il peso dei germogli freschi), nonché la valutazione degli effetti nocivi visibili su diverse parti della pianta. Tali misurazioni e osservazioni sono confrontate con quelle effettuate su piante di controllo non trattate.

Il test è qui eseguito in un'unica concentrazione limite (§ 4; OECD 208:2006). Pertanto, si valuterà se la CE_{50} (la concentrazione con effetto di riduzione del 50% della germinabilità e/o della biomassa formatasi) sia superiore rispetto alla concentrazione testata.

Gli effetti ecotossici sono stati valutati su due piante superiori, una monocotiledone e una dicotiledone:

- *Lepidium sativum* L. (crescione; dicotiledone Classe Magnoliopsida, Ordine Capparales, Famiglia Brassicaceae)
- *Hordeum vulgare* L. (orzo; monocotiledone Classe Liliopsida, Sottoclasse Commelinidae, Ordine Poales, Famiglia Poaceae).

3. Campione oggetto dello studio

In data 17/03/2021, Lab-Control ha provveduto a prelevare presso il punto indicato dal committente il campione, denominato RIFIUTO SOLIDO CAMPIONE 2, e a trasportarlo in giornata al proprio laboratorio di prova, dove è stato identificato con l'ID 202104555.

Il campione, una volta ricevuto, è stato conservato sigillato, a temperatura refrigerata e al riparo dalla luce solare prima dell'esecuzione delle prove e verrà conservato nell'archivio campioni in tali condizioni per un mese dopo la fine dello studio.

4. Sperimentazione

4.1 Preparazione del campione

I potenziali effetti negativi sulle piante vengono valutati sul campione, miscelato al substrato di riferimento (torba e sabbia silicea in rapporto 3:1 p/p), alla concentrazione limite di 1000 mg/kg (§25; OECD 208:2006). Per ciascuna delle due specie vegetali usate, ogni vaso è stato riempito con circa 200 g di miscela substrato+ campione (solo substrato per il controllo). Sulla superficie di 78,5 cm² sono stati seminati 5 semi (da metodo devono essere usati 3-10 semi per 100 cm²), coperti da un sottile strato di materiale inerte (sabbia silicea). Le prove sono state eseguite in quattro repliche. Prima di posizionare i vasi in incubatore, è stata aggiunta acqua in ogni vaso, in modo da raggiungere il 70-100% della capacità di ritenzione idrica.

4.2 Condizioni di esecuzione

Il test viene condotto nelle condizioni ambientali necessarie per la normale crescita delle piante, che vengono mantenute costanti grazie ad un adeguato e frequente monitoraggio (temperatura, umidità, luminosità ecc.). Durante il test sono state adottate le seguenti condizioni:

- temperatura: $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- umidità: $70\% \pm 25\%$
- fotoperiodo: 16 ore di luce / 8 ore di buio
- intensità luminosa: $350 \pm 50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$

Durante il periodo di incubazione le piante sono state osservate frequentemente per verificare l'eventuale presenza di mortalità o segni di fitotossicità.

Alla fine del test sono state valutate ed annotate la percentuale di germinazione e la biomassa di ciascun vaso del campione rispetto a quelle del controllo.

4.3 Validità del test

Il test viene considerato valido quando (§ 6, OECD 208:2006):

- la percentuale di germinazione nel gruppo di controllo è $\geq 70\%$ per le specie vegetali utilizzate;
- il gruppo di controllo non esibisce effetti fitotossici visibili (come clorosi, necrosi, appassimento, deformazioni fogliari ecc.);
- durante il test almeno il 90% delle piante germinate nel gruppo di controllo sopravvivono fino a fine test;
- tutti gli organismi provengono dalla stessa fonte;
- tutte le camere di crescita utilizzate sono identiche per condizioni di esposizione e per numero di vasi contenuti.

4.4 Strumentazione

Comune strumentazione di laboratorio e in particolare:

- Camere di crescita delle piante (incubatori)
- Lampade temporizzate per fotoperiodo
- Vasi in plastica per piante con diametro = 10 cm
- Bilancia analitica
- Essiccatore
- Normale vetreria da laboratorio
- Frigorifero per conservazione

4.5 Reagenti e materiali

Comuni materiali di laboratorio e in particolare:

- Acqua distillata
- Sabbia
- Torba
- Semi di crescione
- Semi di orzo

5. Dati grezzi e calcoli

1° giorno di studio - 19/03/2021

Preparazione del substrato di riferimento e semina del crescione e dell'orzo come sopra indicato.

4° giorno di studio - 23/03/2021

Il 50% dei semi del gruppo di controllo è risultato germinato sia su orzo che su crescione.

18° giorno di studio - 06/04/2021

Sono state raccolte le piante germogliate e sono stati verificati

- il numero di semi germinati su 5 totali,
- la biomassa totale a fresco (peso fresco),
- la biomassa totale e dopo essiccazione a 105 °C (peso secco).

I dati grezzi sono riportati nelle tabelle che seguono, dove P1 = tara, P2 = peso lordo fresco e P3 = peso lordo secco.

Per ogni concentrazione, è stata calcolata la percentuale di germinazione data dalla media dei semi germinati nel compost campione rispetto alla media di quelli germinati nel compost testimone (controllo):

$$\%G = \frac{(media\ n\ semi\ germinati)_{campione}}{(media\ n\ semi\ germinati)_{controllo}} \times 100$$

Analogamente si è proceduto alla valutazione della percentuale di biomassa (fresca o secca):

$$\%BIOMASSA = \frac{(media\ biomassa\ fresca\ o\ secca)_{campione}}{(media\ biomassa\ fresca\ o\ secca)_{controllo}} \times 100$$

Di seguito si riportano i dati grezzi e i valori, in percentuale rispetto al controllo, di germinazione e di biomassa fresca o secca, per le due piante valutate nel corso del presente studio.

		CRESCIONE				
		Peso (g)				
Controllo	N° germinati	P1	P2	P3	P. Fresco	P. Secco
prova 1	5	2,1645	2,3264	2,1761	0,1619	0,0116
prova 2	5	2,1414	2,2843	2,1510	0,1429	0,0096
prova 3	5	2,1573	2,3483	2,1711	0,1910	0,0138
prova 4	5	2,1489	2,3347	2,1608	0,1858	0,0119
Media	5				0,1704	0,0117
		Peso (g)				
Campione	N° germinati	P1	P2	P3	P. Fresco	P. Secco
prova 1	5	2,1530	2,3532	2,1655	0,2002	0,0125
prova 2	5	2,1602	2,3746	2,1767	0,2144	0,0165
prova 3	5	2,1601	2,4144	2,1914	0,2543	0,0313
prova 4	4	2,1510	2,3466	2,1578	0,1956	0,0068
Media	4,8				0,2161	0,0168
Percentuali	95,0				127	143

		ORZO						
		Peso (g)						
Controllo	N° germinati	P1	P2	P3	P. Fresco	P. Secco		
prova 1	5	2,1359	3,9184	2,2799	1,7825	0,1440		
prova 2	5	2,1652	4,1177	2,3212	1,9525	0,1560		
prova 3	5	2,1416	3,9136	2,2761	1,7720	0,1345		
prova 4	5	2,1623	4,2838	2,3346	2,1215	0,1723		
Media	5				1,9071	0,1517		
		Peso (g)						
Campione	N° germinati	P1	P2	P3	P. Fresco	P. Secco		
prova 1	5	2,1604	4,0867	2,2929	1,9263	0,1325		
prova 2	5	2,1383	3,9908	2,3064	1,8525	0,1681		
prova 3	4	2,1615	4,0467	2,2813	1,8852	0,1198		
prova 4	4	2,1520	4,0657	2,2901	1,9137	0,1381		
Media	4,5				1,8944	0,1396		
Percentuali	90,0				99,3	92,0		

6. Risultati

Nelle due tabelle seguenti sono riportati le medie dei valori e l'intervallo di confidenza al 95%. I risultati vanno valutati in termini di germinabilità e peso secco (o in alternativa peso fresco) espressi come percentuale rispetto al controllo.

Crescione a 1000 mg/kg

Valori	Germinati (%)	Peso Fresco (%)	Peso Secco (%)
prova 1	100,0	117,5	106,6
prova 2	100,0	125,8	140,7
prova 3	100,0	149,2	267,0
prova 4	80,0	114,8	58,0
media	95,0	126,8	143,1
DS	10,0	15,7	89,3
Min (media-2DS)	75,0	106,8	123,1
Max (media+2DS)	115,0	146,8	163,1

Di conseguenza, poiché tutte le percentuali calcolate sono superiori al 50%, si può affermare che:

- per la germinabilità $CE_{50} > 1000 \text{ mg/kg}$
- per la biomassa (peso secco) $CE_{50} > 1000 \text{ mg/kg}$
- per la biomassa (peso fresco) $CE_{50} > 1000 \text{ mg/kg}$

Orzo a 1000 mg/kg

Valori	Germinati (%)	Peso Fresco (%)	Peso Secco (%)
prova 1	100,0	101,0	87,3
prova 2	100,0	97,1	110,8
prova 3	80,0	98,9	79,0
prova 4	80,0	100,3	91,0
media	90,0	99,3	92,0
DS	11,5	1,7	13,5
Min (media-2DS)	66,9	76,2	68,9
Max (media+2DS)	113,1	122,4	115,1

Di conseguenza, poiché tutte le percentuali calcolate sono superiori al 50%, si può affermare che:

- per la germinabilità $CE_{50} > 1000 \text{ mg/kg}$
- per la biomassa (peso secco) $CE_{50} > 1000 \text{ mg/kg}$
- per la biomassa (peso fresco) $CE_{50} > 1000 \text{ mg/kg}$

La prova è da considerarsi valida, in quanto sono rispettate tutte le condizioni di validità di cui al § 4.3.

7. Archivi

La presente Relazione Tecnica, il registro attività e tutti i dati grezzi prodotti durante lo studio sono archiviati presso Lab-Control s.r.l.

8. Bibliografia

- OECD/OCDE 208:2006 "OECD guideline for testing of chemicals – Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test"
- REGOLAMENTO (CE) 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) – Allegato Parte C, metodo C.31 "Prova sulle piante terrestri: emergenza delle plantule e crescita delle plantule"

RAPPORTO DI PROVA Nr.: R202105972 del: 09-apr-21 Rev. 0

Richiedente: NEXTECO s.r.l. Via DEI QUARTIERI, 45 - CAP 36016 - THIENE - VI	ID richied: C17063
Committente: NEXTECO s.r.l. Via DEI QUARTIERI, 45 - CAP 36016 - THIENE - VI	ID cliente: C17063

Campione di: MPS CAMPIONE 3	N° lotto/partita: --
Punto di prel.: --	
Proveniente da: C/O CANTIERE BBT, SOTTO ATTRAVERSAMENTO ISARCO FORTEZZA (BZ)	
Nr. Accettazione (ID MAC): M2101258 ID campione: 202104556 Data ricev.: 17-mar-21 Ora ricev.: 17:40	
Descrizione: --	
Categoria Merceologica: PRODOTTI SOLIDI IN GENERE	

Verbale campionamento Nr. (MAC Est): 31841 Data Camp.: 17-mar-21 Ora camp.: 15:00
Metodo di campionamento: (1) UNI 10802:2013
Resp campionamento: Ns. Tecnico Milani p.i. Matteo
Note sul campionamento: La massa del campione di laboratorio è di circa 2 kg. Preparazione del campione ed applicazione del piano di campionamento in accordo alla norma UNI EN 14899:2006 Campione formato da n° 3 aliquote denominate A,B,C.
Condizioni Ambientali: Sereno
Informazioni dichiarate dal committente: MPS NORD LATO AUTOSTRADA -

RISULTATI DI PROVA

Parametri Metodo di Prova	Unità Mis.	Valori riscontrati	Limiti	LOQ	Data Inizio Data Fine	Note
TEST ECOTOSSICOLOGICI	--	--	--	--		
Test di tossicità acuta con Zebrafish (conc. limite - determinazione CL50)	mg/L	>100	--	--	02/04/2021	
OECD/OCDE 203 (2019)					06/04/2021	
Test di tossicità acuta con Daphnia magna Straus (conc. limite - determinazione CE50)	mg/L	>100	--	--	22/03/2021	
OECD/OCDE 202 (2004)					24/03/2021	
Test di tossicità con Pseudokirchneriella subcapitata (conc. limite - determinazione CrE50 e NOEC)	mg/L CrE50 mg/L NOEC	>100 >100	--	--	21/03/2021	
OECD/OCDE 201 (2011)					24/03/2021	
Test di tossicità cronico con Daphnia magna (conc. limite NOEC)	mg/L	>1	--	--	19/03/2021	
OECD/OCDE 211 (2012)					09/04/2021	
Determinazione di effetti ecotossici su piante superiori (conc. Limite) - CE50	mg/kg	>1000	--	--	19/03/2021	
OECD 208 (2006)					06/04/2021	

LOQ = Limite di Quantificazione del metodo di prova utilizzato.

s.s. = sostanza secca tq o non specificato = come campionato

§ = Le prove contrassegnate da questo simbolo sono state eseguite in subappalto da laboratorio esterno.

F=Valore riscontrato superiore alla normativa di riferimento se indicata (Limiti).

L'intervallo di confidenza e/o l'incertezza di misura non sono stati considerati ai fini della valutazione della conformità ai requisiti e/o specifiche.

Nel caso di ricerche multianalita, le somme riportano la sommatoria dei parametri ricercati indicati nel presente rapporto di prova. Qualora i singoli analiti risultino tutti inferiori ai rispettivi LOQ, la somma sarà posta inferiore al limite di quantificazione più alto.

() Nei campioni di emissione in atmosfera, i valori riportati tra parentesi, se presenti, esprimono le concentrazioni degli inquinanti in flusso di massa. Per valori riscontrati elevati (ad es. microbiologici) i valori vengono espressi in forma esponenziale secondo il Sistema metrico Internazionale: ad es. $10E+06 = 10000000$, $54E+05 = 5400000$, dove E indica il numero di zeri da aggiungere alla cifra iniziale, questo per rendere più leggibile il rapporto di prova.

() Nei campioni di emissione in atmosfera, i valori riportati tra parentesi, se presenti, esprimono le concentrazioni degli inquinanti in flusso di massa. Per valori riscontrati elevati (ad es. microbiologici) i valori vengono espressi in forma esponenziale secondo il Sistema metrico Internazionale: ad es. $10E+06 = 10000000$, $54E+05 = 5400000$, dove E indica il numero di zeri da aggiungere alla cifra iniziale, questo per rendere più leggibile il rapporto di prova.

Note ai risultati di prova:

- Per la prova eseguita secondo il metodo "OECD/OCDE 203 (1992) Test di tossicità acuta con Zebrafish (conc. limite - determinazione CL50)" vedasi Relazione Tecnica RT210285**
- Per la prova eseguita secondo il metodo "OECD/OCDE 202 (2004) Test di tossicità acuta con Daphnia magna Straus (conc. limite - determinazione CE50)" vedasi Relazione Tecnica RT210286**
- Per la prova eseguita secondo il metodo "OECD/OCDE 201 (2011) Test di tossicità con Pseudokirchneriella subcapitata (conc. limite - determinazione CrE50 e NOEC)" vedasi Relazione Tecnica RT210287**
- Per la prova eseguita secondo il metodo "OECD/OCDE 211 (2012) Test di tossicità cronico con Daphnia magna (conc. limite NOEC)" vedasi Relazione Tecnica RT210288**
- Per la prova eseguita secondo il metodo "OECD 208 (2006) Determinazione di effetti ecotossici su piante superiori (conc. Limite) - CE50" vedasi Relazione Tecnica RT210289**

Stato delle revisioni del rapporto di prova

Revisione	Data Rev.	Motivo Revisione
0	09-apr-21	prima emissione

Documento firmato digitalmente con firma autorizzata dall'ordine professionale ai sensi del Regolamento UE n. 910/2014 del 23/07/2014 e smi.

Direttore Tecnico

PASI Dott.ssa Chim.MANUELA

n°734 Ordine Int. Chimici Veneto

Per DATA INIZIO si intende la data di presa in carico del campione, per DATA FINE si intende la data di avvenuta verifica del dato analitico. I dati riportati nel presente Rapporto di Prova sono riferiti esclusivamente al campione sottoposto alle prove. La riproduzione parziale del presente Rapporto di Prova deve essere autorizzata per iscritto dal laboratorio. Un controcampione, se non deperibile o esaurito nel corso delle prove, è conservato presso il laboratorio per 30 giorni dalla data di emissione del rapporto di prova, salvo diversi accordi contrattuali. I dati grezzi ed i tracciati strumentali sono archiviati per 10 anni. (1) In assenza di indicazioni si intende che il campione è stato provato come pervenuto in laboratorio ed i dati di prelievo, la tipologia del campione e la provenienza del campione è stata indicata dal committente.

Azienda con Sistema di Gestione per la Qualità certificato UNI EN ISO 9001:2015 - Certificato CSQA n.131 - Registrazione IQ-Net n.IT-4818
Laboratorio inserito nell'elenco dei Laboratori accreditati dalla Regione Veneto ai sensi dell'art.54, comma 2 della L.R. n.33/1985
Laboratorio iscritto nel Registro Regionale del Veneto n.19 dei Laboratori non annessi alle industrie alimentari ai fini dell'autocontrollo ai sensi dell'accordo Stato - Regioni Rep. Atti n.78/CSR del 8 luglio 2010.
Laboratorio iscritto all'Albo dei Laboratori di Ricerca con Decreto Dirigenziale n.1417/Ric. Del 28 giugno 2005.
Laboratorio inserito con il DM 10 aprile 2009 nell'elenco dei laboratori competenti a prestare i servizi necessari per verificare la conformità dei fertilizzanti ed ammendanti ai sensi del Decreto Legislativo n. 75/2010.



**STUDIO DI TOSSICITÀ ACUTA
IN AMBIENTE ACQUATICO
CON *BRACHYDANIO RERIO* - ZEBRAFISH
(Concentrazione limite)**

Campione in prova:

MPS CAMPIONE 3
(ID campione: 202104556)

Relazione Tecnica n.:

RT 210285 rev. 00
del 08/04/2021

Committente:

NEXTECO s.r.l.
Via Dei Quartieri, n. 45
36016 Thiene (VI)

STATO DELLE REVISIONI DEL DOCUMENTO

REV.	DATA	OGGETTO DELLA REVISIONE
00	08/04/2021	EMISSIONE DOCUMENTO

PROCEDIMENTO DI APPROVAZIONE

ESECUTORE PROVE		REDATTO		APPROVATO	
FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA
RESPONSABILE REPARTO ECOTOSSICOLOGIA	Tagliati Chiara	Vice DIRETTORE TECNICO	Zecchini Fulvio	DIRETTORE TECNICO	Pasi Manuela

SOMMARIO

1. Riassunto	3
2. Obiettivo dello studio.....	3
3. Campione oggetto dello studio	3
4. Sperimentazione.....	3
4.1 Metodo di prova	3
4.2 Apparecchiatura utilizzata	3
4.3 Reagenti.....	4
4.4 Preparazione del campione	4
4.5 Altri dettagli della prova.....	4
5. Dati grezzi	6
6. Calcoli	8
6.1 Criteri di validità.....	8
7. Risultati e conclusioni	8
8. Archivi	8
9. Bibliografia.....	8

Autorizzazione utilizzo *Brachydanio rerio* a fini scientifici

Lab-Control è autorizzato Ministero della Salute, ai sensi del D.Lgs. 26/2014 “Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici”, quale stabilimento utilizzatore di *Brachydanio rerio* e altre specie ittiche a fini scientifici (autorizzazione n. 1/2015-UT del 29/01/2015).

Ogni stabilimento utilizzatore deve presentare un progetto di ricerca ex art. 31 del D.Lgs. 26/2014 per poter utilizzare vertebrati in laboratorio. In data 15/01/2021, il Ministero, con autorizzazione n. 40/2021-PR, ha approvato il nuovo progetto di Lab-Control (prot. C4BC0.0) “Test di tossicità acuta su pesci con metodo OECD 203:2019 e Reg. EU 440/2008 Allegato Parte C, metodo C.1, per l’attribuzione della caratteristica di pericolosità HP 14 (ecotossico) a sostanze/miscele chimiche e rifiuti”, come progetto di tipo regolatorio, soggetto ad approvazione di Fase A (generale) e di Fase B (specifica per ogni campione da testare). Prima di procedere alla prova con *B. rerio*, si deve inviare al Ministero una scheda descrittiva di Fase B per ogni campione da analizzare, attraverso il portale stabulari. Per l’autorizzazione di ogni scheda devono essere corrisposti i diritti di cui al D.M. 27/03/2019, Tariffa F – ex art. 31 e 33, D.Lgs. 26/2014. L’approvazione avviene entro 5 giorni lavorativi, trascorsi i quali il portale indica che si può procedere alla prova (silenzio/assenso).

1. Riassunto

La presente relazione tecnica riassume in modo completo tutti i dati raccolti nel corso dello studio, le condizioni di esposizione dei pesci alla concentrazione limite del campione e i risultati calcolati.

I pesci, di lunghezza totale raccomandata di 1-2 cm, sono esposti al campione di prova, aggiunto all'acqua, per un periodo di 96 ore. La mortalità viene registrata a 24, 48, 72 e 96 ore e confrontata con i valori ottenuti dal controllo.

2. Obiettivo dello studio

Lo scopo del presente test è stato quello di determinare l'effetto della concentrazione limite del campione di prova in ambiente acquatico, sul pesce d'acqua dolce *Brachydanio rerio*, per valutare se questo campione possa presentare effetti di tossicità acuta.

3. Campione oggetto dello studio

In data 17/03/2021, Lab-Control ha provveduto a prelevare presso il punto indicato dal committente il campione, denominato MPS CAMPIONE 3, e a trasportarlo in giornata al proprio laboratorio di prova, dove è stato identificato con l'ID 202104556.

Il campione, una volta ricevuto, è stato conservato sigillato, a temperatura refrigerata e al riparo dalla luce solare prima dell'esecuzione delle prove e verrà conservato nell'archivio campioni in tali condizioni per un mese dopo la fine dello studio.

4. Sperimentazione

4.1 Metodo di prova

Il seguente studio fa riferimento al metodo OECD/OCDE 203:2019 – OECD guideline for testing of chemicals - Fish, Acute Toxicity Test, integrato con le indicazioni del Regolamento CE 440/2008 - Allegato Parte C, C.1. Tossicità acuta per pesci.

4.2 Apparecchiatura utilizzata

- Acquari per la stabulazione dei pesci, dotati di pompa di calore, sistema filtrante e sistema di illuminazione.
- Recipienti aventi un volume di 5 L, in plastica trasparente per evitare processi di adsorbimento o di rilascio di sostanze che possono interferire con il saggio.
- Lampade fluorescenti che diano una illuminazione attenuata di circa 1500-2000 lux.
- Temporizzatore per il controllo del fotoperiodo.
- Termometri capaci di registrare la temperatura massima e minima.
- Pompe per acquari.
- Ossimetro per la misurazione dell'ossigeno disciolto.
- pH-metro.
- Equipaggiamento di laboratorio per la determinazione della durezza.
- Normale vetreria di laboratorio.

4.3 Reagenti

ORGANISMO TEST

Il *Brachydanio rerio* (Zebrafish) è la specie sperimentale utilizzata. Il fornitore è il Model Organism Facility Department of Cellular, Computational and Integrative Biology – CIBIO, University of Trento (fornitore autorizzato ai sensi dell'art. 20 del D.Lgs. 26/2014). I pesci utilizzati per il saggio erano in buona salute e non presentavano evidenti malformazioni, come dichiarato nel certificato rilasciato dal fornitore. I pesci provenivano da un singolo gruppo con lunghezza (1-2 cm) ed età simili. Sono stati mantenuti per 9 giorni (2 di assestamento e poi 7 di acclimatazione) nelle seguenti condizioni:

- densità degli animali: un carico di biomassa di 0,8 g/L;
- acqua: vedi paragrafo successivo;
- concentrazione dell'ossigeno disciolto: vedi paragrafo successivo;
- illuminazione: fotoperiodo da 12 a 16 ore al giorno;
- alimentazione: tre volte alla settimana o quotidianamente con sospensione 24 ore prima dell'inizio della prova.

ACQUA DI ALLEVAMENTO E DI DILUIZIONE

Per l'allevamento e le diluizioni è stata utilizzata acqua potabile, decantata per 24 ore al fine di eliminare il cloro residuo, non contaminata da concentrazioni potenzialmente pericolose di metalli pesanti o altri inquinanti. Tale acqua aveva le seguenti caratteristiche specificate da metodo:

- concentrazione $O_2 > 5,14$ mg/L a 23°C e 1 atm
- salinità = 0,16‰* (calcolata dalla conducibilità; deve essere $< 0,2$ ‰)
- pH = 7,7* (deve essere 6,0-8,5)
- durezza = 140 mg $CaCO_3/L$ * (deve essere 40-250 mg $CaCO_3/L$, preferibilmente < 180 mg $CaCO_3/L$)

*fonte dati: Acquevenete 2021 (www.acquevenete.it)

4.4 Preparazione del campione

Le concentrazioni testate sono state ottenute partendo da una soluzione madre con rapporto solido/liquido 1:10 S/L, preparata mediante lisciviazione del campione a granulometria = 4 mm con acqua di allevamento secondo la norma UNI EN 14735:2005 (EC-1-2008) "Caratterizzazione di rifiuti - Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche". La soluzione è stata messa poi ad agitare con miscelatore a rovesciamento a 10 rpm per 24 h a 23°C. L'estratto acquoso è stato lasciato sedimentare per 15 minuti. Infine, è stato filtrato su membrana 0,45 µm prima di allestire la prova.

Il controllo negativo è composto dalla sola acqua di allevamento.

4.5 Altri dettagli della prova

Gruppi test e controlli

I contenitori di prova sono stati riempiti con 3 L di acqua di diluizione e soluzione del campione di prova (solo acqua di diluizione per il controllo).

Come indicato al § 30 "Test limite" del metodo di prova OECD/OCDE 203:2019, al fine di ridurre il numero di esemplari utilizzati, può essere eseguita una prova preliminare con un solo contenitore con 7 pesci sia per il test che per il controllo. Se con 7-10 pesci per contenitore si registra al massimo un decesso, secondo la teoria

binomiale (equazione di Bernoulli con $p=q=50\%$) c'è almeno il 94-99% di probabilità che la CL_{50} sia maggiore della concentrazione limite testata.

Concentrazione del test

È stata utilizzata una concentrazione limite di prova pari a 100 mg/L.

Condizioni di esposizione

La prova è stata effettuata in modalità statica.

La temperatura è rimasta compresa nell'intervallo $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ed è stato applicato un ciclo di 16 ore di luce e 8 ore di buio, con intensità di 540-1000 lumen.

La densità degli individui in prova è di circa 0,8 g/L (peso umido).

La concentrazione di ossigeno $\geq 60\%$ (ovvero 5,14 mg/L a 23°C e 1 atm) del valore di saturazione in aria (8,56 mg/L a 23°C e 1 atm, fonte: FAO, 1987, ARAC/87/WP/12(9)).

I recipienti di prova non sono stati aerati durante il test, che è stato effettuato senza regolazione del pH.

I pesci non sono stati alimentati durante la prova.

Durata

La durata del test è stata di 96 ore, escluse le fasi di preparazione.

5. Dati grezzi

1° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 01/04/2021

Nel primo giorno dello studio è stato preparato l'estratto acquoso del campione come sopra descritto.

2° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 02/04/2021

L'eluato è stato filtrato su filtri rapidi e poi su filtri con porosità 0,45 µm. Quindi sono state realizzate le diluizioni necessarie. Per la concentrazione testata e per il controllo sono stati misurati giornalmente i valori di pH e di ossigeno disciolto (Tab. 1).

Tab. 1: valori di pH e ossigeno disciolto per la concentrazione testata e per il controllo all'inizio del test

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,62	8,14
100 mg/L	8,69	8,23

I pesci sono stati esaminati dopo le prime 2-4 ore e non si sono osservate mortalità o anomalie.

3° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 03/04/2021

Dopo 24 ore di esposizione sono stati controllati gli organismi all'interno dei contenitori per contare gli eventuali morti (Tab. 2).

Tab. 2: numero di organismi morti per contenitore dopo 24 ore.

Concentrazione	Decessi
Controllo	0/7
100 mg/L	0/7

Tab. 3: valori di pH e ossigeno disciolto per la concentrazione testata e per il controllo dopo 24 ore di esposizione

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,60	8,29
100 mg/L	8,69	8,37

Dopodiché tutti i contenitori sono stati rimessi alle stesse condizioni per altre 24 ore di esposizione.

4° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 04/04/2021

Dopo altre 24 ore di esposizione, sono stati controllati gli organismi all'interno dei contenitori per contare gli eventuali morti (Tab. 4).

Tab. 4: numero di organismi morti per contenitore dopo 48 ore.

Concentrazione	Decessi
Controllo	0/7
100 mg/L	0/7

Tab. 5: valori di pH e ossigeno disciolto dopo 48 ore di esposizione

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,61	8,44
100 mg/L	8,70	8,52

Dopodiché tutti i contenitori sono stati rimessi alle stesse condizioni per altre 24 ore di esposizione.

5° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 05/04/2021

Dopo altre 24 ore di esposizione, sono stati controllati gli organismi all'interno dei contenitori per contare gli eventuali morti (Tab. 6).

Tab. 6: numero di organismi morti per contenitore dopo 72 ore.

Concentrazione	Decessi
Controllo	0/7
100 mg/L	0/7

Tab. 7: valori di pH e ossigeno disciolto dopo 72 ore di esposizione

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,63	8,58
100 mg/L	8,68	8,66

6° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 06/04/2021

Dopo altre 24 ore di esposizione, sono stati controllati gli organismi all'interno dei contenitori per contare gli eventuali morti (Tab. 8).

Tab. 8: numero di organismi morti per contenitore dopo 96 ore.

Concentrazione	Decessi
Controllo	0/7
100 mg/L	0/7

Tab. 9: valori di pH e ossigeno disciolto dopo 96 ore di esposizione

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,62	8,73
100 mg/L	8,68	8,80

6. Calcoli

Alla concentrazione limite di 100 mg/L, il campione non induce la mortalità di alcuno dei sette Zebrafish in prova (0/7). Nel test limite non è comunque possibile calcolare la CL₅₀ (vedi anche § 7).

6.1 Criteri di validità

I criteri di validità di cui al § 7 dell'OECD 203:2019 e § 1.5 del "REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 sono rispettati.

Dopo 96 ore di esposizione:

- la mortalità nel controllo è ≤ 10% (nel test limite con 7 pesci è ammesso un solo decesso)
- i valori di pH sono rimasti approssimativamente nell'intervallo 6,0-8,5
- l'ossigeno disciolto non è mai sceso al di sotto del 60% del valore di saturazione in aria a 23°C e 1 atm (5,14 mg/L)
- la determinazione analitica della concentrazione del test non è applicabile per la matrice testata

7. Risultati

Tossicità acuta CL₅₀ > 100 mg/L

Alla concentrazione limite di 100 mg/L, il campione non induce la mortalità di alcuno dei sette Zebrafish in prova (0/7), a dimostrazione della mancanza di effetto tossico. La CL₅₀ risulta, quindi, maggiore di 100 mg/L.

8. Archivi

La presente Relazione Tecnica, il registro attività e tutti i dati grezzi prodotti durante lo studio sono archiviati presso Lab-Control s.r.l.

9. Bibliografia

1. OECD/OCDE 203:2019 – OECD guideline for testing of chemicals – Fish, Acute Toxicity Test.
2. REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 DELLA COMMISSIONE del 30 maggio 2008 (testo consolidato 2017) 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) – Allegato Parte C, metodo C.1. – Tossicità acuta per i pesci.
3. UNI EN 14735:2005 - Caratterizzazione dei rifiuti. Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche.



STUDIO DI TOSSICITÀ ACUTA IN AMBIENTE ACQUATICO CON *DAPHNIA MAGNA STRAUS* (Concentrazione limite)

Campione in prova:

MPS CAMPIONE 3
(ID campione: 202104556)

Relazione Tecnica n.:

RT 210286 rev. 00
del 08/04/2021

Committente:

NEXTECO s.r.l.
Via Dei Quartieri, n. 45
36016 Thiene (VI)

STATO DELLE REVISIONI DEL DOCUMENTO

REV.	DATA	OGGETTO DELLA REVISIONE
00	08/04/2021	EMISSIONE DOCUMENTO

PROCEDIMENTO DI APPROVAZIONE

ESECUTORE PROVE		REDATTO		APPROVATO	
FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA
RESPONSABILE REPARTO ECOTOSSICOLOGIA	Tagliati Chiara	Vice DIRETTORE TECNICO	Zecchini Fulvio	DIRETTORE TECNICO	Pasi Manuela

SOMMARIO

1. Riassunto	3
2. Obiettivo dello studio.....	3
3. Campione oggetto dello studio	3
4. Sperimentazione.....	3
4.1 Metodo di prova	3
4.2 Sostanza di riferimento	3
4.3 Riferimenti normativi	3
4.4 Apparecchiatura utilizzata	3
4.5 Reagenti e materiali	4
4.6 Preparazione del campione	4
4.7 Altri dettagli della prova	4
5. Dati grezzi	5
6. Calcoli	5
6.1 Criteri di validità.....	6
7. Risultati e conclusioni	6
8. Archivi	6
9. Bibliografia.....	6

1. Riassunto

La presente relazione tecnica riassume in modo completo tutti i dati raccolti nel corso dello studio, come la preparazione della concentrazione limite, delle condizioni di esposizione delle daphnie al campione e i risultati calcolati.

I giovani dafnidi, di età inferiore a 24 ore alla partenza della prova, sono stati esposti al campione di prova, alla concentrazione limite di 100 mg/L, per un periodo di 48 ore. L'immobilizzazione è stata registrata a 24 ore e 48 ore e confrontata con i valori ottenuti dal controllo.

2. Obiettivo dello studio

Lo scopo del presente studio è quello di calcolare se la CE₅₀ (concentrazione che immobilizza il 50% degli esemplari) a 48h del campione sia superiore alla concentrazione limite di 100 mg/L. Ciò al fine di verificare se ha un effetto negativo sul crostaceo d'acqua dolce *Daphnia magna* Straus e, quindi, se presenta tossicità acuta per l'ambiente acquatico.

3. Campione oggetto dello studio

In data 17/03/2021, Lab-Control ha provveduto a prelevare presso il punto indicato dal committente il campione, denominato MPS CAMPIONE 3, e a trasportarlo in giornata al proprio laboratorio di prova, dove è stato identificato con l'ID 202104556.

Il campione, una volta ricevuto, è stato conservato sigillato, a temperatura refrigerata e al riparo dalla luce solare prima dell'esecuzione delle prove e verrà conservato nell'archivio campioni in tali condizioni per un mese dopo la fine dello studio.

4. Sperimentazione

4.1 Metodo di prova

Il seguente studio fa riferimento al metodo "OECD/OCDE 202:2004 – OECD guideline for testing of chemicals – *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test" e al corrispettivo metodo del REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 del 30 maggio 2008 – Allegato Parte C, metodo C.2. Saggio di immobilizzazione acuta in *Daphnia* sp.

4.2 Sostanza di riferimento

Una sostanza di riferimento (controllo positivo) può essere testata per la CE₅₀ come mezzo per assicurare che le condizioni di prova siano affidabili (§ 5, OECD 202:2004). Da metodo la CE₅₀ del bicromato di potassio deve attestarsi all'interno dell'intervallo 0,6-2,1 mg/L.

4.4 Apparecchiatura utilizzata

- Scatole con pozzetti da 10 ml, ermeticamente chiuse, in plastica per evitare processi di adsorbimento o di rilascio di sostanze che possono interferire con il saggio.
- Incubatore capaci di operare alla temperatura di 20 ± 2°C.
- Lampade fluorescenti con illuminazione attenuata di circa 1500-2000 lux.
- Temporizzatore per il controllo del fotoperiodo.
- Ossimetro per la misurazione dell'ossigeno disciolto.
- pHmetro.
- Normale vetreria di laboratorio.

4.4 Reagenti e materiali

ORGANISMO TEST

Daphnia magna Straus è la specie sperimentale utilizzata (sub-allevamento come da indicazioni del metodo del lotto DM 121219, Daphtoxkit F magna, fornitore: Ecotox LDS). All'inizio della prova gli animali avevano meno di 24 ore di vita e, per ridurre la variabilità, non provenivano dalla prima nidiata e derivavano da un allevamento sano (senza segni di stress come alta mortalità, assenza di maschi e efippi, nessun ritardo nella produzione della prima nidiata, animali scoloriti assenti, ecc.). Gli animali sono stati mantenuti in condizioni di allevamento (luce, temperatura, mezzo) simili a quelle previste per la prova: la covata delle dafnie è stata mantenuta in acqua di diluizione alla temperatura di prova per almeno 48 ore prima dell'inizio del test.

ACQUA DI ALLEVAMENTO E DI DILUIZIONE

Si usa un'acqua minerale che si è dimostrata idonea durante diverse prove nel nostro laboratorio all'allevamento delle dafnie (§§ 10 e 11 OECD 202:2004). Essa possiede le seguenti caratteristiche fondamentali per l'allevamento:

- Residuo fisso a 180 °C = 181,6 mg/L
- pH = 7,61
- Conducibilità elettrica specifica a 20°C = 297,6 µS/cm

4.5 Preparazione del campione

Le concentrazioni testate sono state ottenute partendo da una soluzione madre con rapporto solido/liquido 1:10 S/L, preparata mediante lisciviazione del campione a granulometria = 4 mm con acqua di allevamento secondo la norma UNI EN 14735:2005 (EC-1-2008) "Caratterizzazione di rifiuti - Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche". La soluzione è stata messa poi ad agitare con miscelatore a rovesciamento a 10 rpm per 24 h a 23°C. L'estratto acquoso è stato lasciato sedimentare per 15 minuti. Infine, è stato filtrato su membrana 0,45 µm prima di allestire la prova.

Il controllo negativo è composto dalla sola acqua di allevamento.

4.7 Altri dettagli della prova

Gruppi test e controlli

I contenitori di prova sono stati riempiti con 10 ml di acqua di diluizione e soluzione del campione di prova; il rapporto di volume di aria/acqua nei recipienti era identico per prova e gruppi di controllo.

Le Dafnie sono state poi collocate nei recipienti di prova e, sia per la diluizione limite che per il controllo sono stati esaminati 20 animali, suddivisi in quattro gruppi di cinque animali ciascuno.

Concentrazione del test

Ai sensi del § 24 del metodo OECD 202:2004, è stata utilizzata la concentrazione limite di 100 mg/L.

Condizioni di incubazione

La temperatura è rimasta compresa a 20±1°C. È stato applicato un ciclo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. I recipienti di prova non sono stati aerati durante il test. Il test è stato effettuato senza regolazione del pH. I dafnidi non sono stati alimentati durante la prova.

Durata

La durata del test è stata di 48 ore, escluse le fasi di preparazione.

5. Dati grezzi

1° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 21/03/2021

Nel primo giorno dello studio è stato preparato l'estratto acquoso del campione come sopra descritto.

2° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 22/03/2021

A fine agitazione l'eluato è stato filtrato su filtri rapidi e poi su filtri con porosità 0,45 µm, quindi sono state realizzate le diluizioni da impiegare nelle prove.

Sono stati misurati i valori di valori di pH e di ossigeno disciolto per la diluizione preparata (Tab. 1).

Tab. 1: valori di pH e di ossigeno disciolto per la diluizione testata e per il controllo all'inizio del test.

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	7,98	9,75
100 mg/L	8,04	9,72

3° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 23/03/2021

Dopo 24 ore di esposizione, sono stati controllati gli organismi all'interno dei contenitori per contare gli eventuali immobilizzati (Tab. 2).

Tab. 2: numero di organismi immobilizzati per contenitore dopo 24 ore.

Concentrazione	1° REPLICA	2° REPLICA	3° REPLICA	4° REPLICA	TOTALE
Controllo	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20
100 mg/L	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20

Inoltre, sono stati registrati i valori di pH e di ossigeno disciolto (Tab. 3).

Tab. 3: valori di pH e di ossigeno disciolto per la concentrazione testata e per il controllo dopo 24 ore di esposizione

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,29	9,31
100 mg/L	8,33	9,50

Dopodiché tutti i contenitori sono stati rimessi alle stesse condizioni per altre 24 ore di esposizione.

4° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 24/03/2021

Dopo altre 24 ore di esposizione, sono stati controllati gli organismi all'interno dei contenitori per contare gli eventuali immobilizzati (Tab. 4).

Tab. 4: numero di organismi immobilizzati per contenitore dopo 48 ore.

Concentrazione	1° REPLICA	2° REPLICA	3° REPLICA	4° REPLICA	TOTALE
Controllo	1/5	0/5	0/5	0/5	1/20
100 mg/L	1/5	0/5	0/5	0/5	1/20

Inoltre, sono stati registrati i valori di pH e di ossigeno disciolto (Tab. 5).

Tab. 5: valori di pH e di ossigeno disciolto per la concentrazione testata e per il controllo dopo 48 ore di esposizione

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,60	8,86
100 mg/L	8,62	9,27

6. Calcoli

Nei test in concentrazione limite non è possibile calcolare il valore di CE_{50} . Alla concentrazione limite di 100 mg/L, il campione testato non induce effetti negativi rilevanti sui crostacei (immobilizzati = 1/20). Ovvero, ai sensi del § 24 "Test limite" del metodo OECD 202:2004, l'immobilizzazione non eccede il 10% degli individui totali delle repliche del campione: il valore di CE_{50} risulta, quindi, maggiore di 100 mg/L.

6.1 Criteri di validità

Il test è da considerarsi valido ai sensi del § 6, OECD 202:2004, dato che:

- nel controllo non è stata riscontrata immobilità degli organismi > 10%
- l'ossigeno disciolto alla fine del test, sia nella concentrazione testata del campione che nel controllo, è > 3 mg/L

Inoltre:

- tutti i valori di pH non sono variati più di 1,0 unità durante la prova
- controllo positivo su materiale di riferimento (MR): in un circuito nazionale di inter-calibrazione controllo positivo su materiale di riferimento (MR): nel circuito nazionale di inter-calibrazione Waste-Etox-3 organizzato da UNICHIM e conclusosi il 17/12/2020, per i valori di CE_{50} a 24h (una replica) e 48h (due repliche) di una soluzione di riferimento di bicromato di potassio sono stati trovati rispettivamente valori di Z-score pari a -1,43 e 0,00/0,74 (deve essere $-2 < Z < +2$)

7. Risultati

Tossicità acuta: $CE_{50} > 100$ mg/L

Alla concentrazione limite di 100 mg/L, il campione testato non induce effetti negativi rilevanti sui crostacei (immobilizzati = 1/20; valore accettabile per il test limite). Il valore di CE_{50} risulta, quindi, maggiore di 100 mg/L.

8. Archivi

La presente Relazione Tecnica e tutti i dati grezzi prodotti durante lo studio sono archiviati presso Lab-Control s.r.l.

9. Bibliografia

1. OECD/OCDE 202:2004 – OECD guideline for testing of chemicals – *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test
2. REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 DELLA COMMISSIONE del 30 maggio 2008 (testo consolidato 2017) 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) – Allegato Parte C, metodo C.2. Saggio di immobilizzazione acuta in *Daphnia* sp.
3. UNI EN 14735:2005 - Caratterizzazione dei rifiuti. Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche.



STUDIO DI ECOTOSSICITÀ IN AMBIENTE ACQUATICO CON *PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA* (Concentrazione limite)

Campione in prova:
MPS CAMPIONE 3
(ID campione: 202104556)

Relazione Tecnica n.:
RT 210287 rev. 00
del 09/04/2021

Committente:
NEXTECO s.r.l.
Via Dei Quartieri, n. 45
36016 Thiene (VI)

STATO DELLE REVISIONI DEL DOCUMENTO

REV.	DATA	OGGETTO DELLA REVISIONE
00	09/04/2021	EMISSIONE DOCUMENTO

PROCEDIMENTO DI APPROVAZIONE

ESECUTORE PROVE		REDATTO		APPROVATO	
FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA
RESPONSABILE REPARTO ECOTOSSICOLOGIA	Tagliati Chiara	Vice DIRETTORE TECNICO	Zecchini Fulvio	DIRETTORE TECNICO	Pasi Manuela

SOMMARIO

1. Riassunto	3
2. Obiettivo dello studio.....	3
3. Campione oggetto dello studio	3
4. Sperimentazione.....	3
4.1 Metodo di prova	3
4.2 Sostanza di riferimento	3
4.3 Apparecchiatura utilizzata	3
4.4 Reagenti.....	4
4.5 Preparazione del campione	4
4.6 Altri dettagli della prova	5
5. Dati grezzi	6
6. Calcoli	7
6.1 Analisi statistica	9
6.2 Criteri di validità.....	10
7. Risultati e conclusioni	14
8. Archivi	14
9. Bibliografia.....	14

1. Riassunto

La presente relazione tecnica riassume in modo completo tutti i dati raccolti nel corso dello studio, come la preparazione della concentrazione limite, le condizioni di esposizione delle alghe al campione e i risultati calcolati.

Le alghe, in crescita esponenziale alla partenza della prova, sono state esposte al campione di prova, alla concentrazione limite concordata col committente di 100 mg/L, per un periodo di 72 ore. La concentrazione algale è stata registrata a 24, 48 e 72 ore e confrontata con i valori ottenuti dal controllo.

2. Obiettivo dello studio

Lo scopo del presente studio è quello di determinare se il valore di CrE₅₀ (la concentrazione stimata che provoca una riduzione del 50% del tasso di crescita rispetto al controllo) del campione in prova sia maggiore della concentrazione limite testata di 100 mg/L sull'alga d'acqua dolce *Pseudokirchneriella subcapitata* (conosciuta anche come *Selenastrum capricornutum*), per valutare se questo campione possa presentare effetti di tossicità acuta per l'ambiente acquatico. Verrà valutata anche la NOEC (No Observed Effect Concentration) per stimare possibili effetti di tossicità cronica del campione.

3. Campione oggetto dello studio

In data 17/03/2021, Lab-Control ha provveduto a prelevare presso il punto indicato dal committente il campione, denominato MPS CAMPIONE 3, e a trasportarlo in giornata al proprio laboratorio di prova, dove è stato identificato con l'ID 202104556.

Il campione, una volta ricevuto, è stato conservato sigillato, a temperatura refrigerata e al riparo dalla luce solare prima dell'esecuzione delle prove e verrà conservato nell'archivio campioni in tali condizioni per un mese dopo la fine dello studio.

4. Sperimentazione

4.1 Metodo di prova

Il metodo di prova utilizzato è l'OECD 201:2006 (Annex 5 corrected 2011) "GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test".

4.2 Sostanza di riferimento

Una sostanza di riferimento (controllo positivo), es. il bicromato di potassio, può essere testata per la CrE₅₀ come mezzo per assicurare che le condizioni di prova siano affidabili (§ 12, OECD 201:2006).

4.3 Apparecchiatura utilizzata

- Celle lunghe 10 cm con capacità di 25ml, in polistirene per evitare processi di adsorbimento o di rilascio di sostanze che possono interferire con il saggio e dotate di tappo.
- Incubatore, capace di operare alla temperatura di 23 ± 2°C.
- Lampade fluorescenti che diano una illuminazione continua superiore a 6000 lux.
- pH-metro
- Autoclave
- Normale vetreria di laboratorio
- Spettrofotometro

4.4 Reagenti

ORGANISMO TEST

L'alga *Pseudokirchneriella subcapitata* è la specie sperimentale utilizzata (sub-coltivazioni secondo metodo dell'ALGALTOXKIT F lotto SC290920, fornitore: Ecotox LDS).

All'inizio della prova, la coltura si trova in fase di crescita esponenziale.

ACQUA DI COLTIVAZIONE E DI DILUIZIONE

L'acqua si prepara aggiungendo un appropriato volume di soluzione stock disciogliendo i sali in acqua distillata seguendo le quantità indicate nella tabella seguente.

Nutrienti	Concentrazione
<i>Stock solution 1: macro nutrienti</i>	
NH ₄ Cl	1.5 g/L
MgCl ₂ •6H ₂ O	1.2 g/L
CaCl ₂ •2H ₂ O	1.8 g/L
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.5 g/L
KH ₂ PO ₄	0.16 g/L
<i>Stock solution 2: ferro</i>	
FeCl ₃ •6H ₂ O	64 mg/L
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	100mg/L
<i>Stock solution 3: elementi in tracce</i>	
H ₃ BO ₃	185 mg/
MnCl ₂ •4H ₂ O	415 mg/L
ZnCl ₂	3 mg/L
CoCl ₂ •6H ₂ O	1.5mg/L
CuCl ₂ •2H ₂ O	0.01 mg/L
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	7 mg/L
<i>Stock solution 4: bicarbonato</i>	
NaHCO ₃	50 g/L

Le soluzioni stock vanno sterilizzate mediante filtrazione o mediante autoclave.

Preparazione del medium di crescita

Il medium di crescita si prepara aggiungendo a 1 litro di medium finito 10 mL della stock solution 1, 1 mL della stock solution 2, 1 mL della stock solution 3 e 1 mL della stock solution 4. Si porta a volume con acqua distillata. Prima dell'uso, si satura di ossigeno lasciandola a contatto con l'aria durante la notte, o insufflando aria per circa 30 minuti. Dopo tale operazione, se necessario, viene aggiustato il pH a 8,1±0,2 usando acido idroclorico 1 mol/L o idrossido di sodio 1 mol/L.

4.5 Preparazione del campione

Le concentrazioni testate sono state ottenute partendo da una soluzione madre con rapporto solido/liquido 1:10 S/L, preparata mediante lisciviazione del campione a granulometria = 4 mm con acqua di allevamento secondo la norma UNI EN 14735:2005 (EC-1-2008) "Caratterizzazione di rifiuti - Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche". La soluzione è stata messa poi ad agitare con miscelatore a rovesciamento a 10 rpm per 24 h a 23°C. L'estratto acquoso è stato lasciato sedimentare per 15 minuti. Infine, è stato filtrato su membrana 0,45 µm prima di allestire la prova.

Il controllo negativo è composto dalla sola acqua di coltivazione.

4.6 Altri dettagli della prova

Gruppi test e controlli

Per ottenere il medium da mettere in prova col campione sono stati utilizzati appropriati volumi dell'eluato e dell'inoculo. Per il controllo negativo l'eluato è sostituito dal solo medium di coltura delle alghe.

La densità cellulare iniziale era sufficientemente bassa da permettere una crescita esponenziale nella cultura di controllo durante la durata del test senza che il pH vari più di 1,5 unità circa.

Si preparano sei repliche per ogni concentrazione.

Si misura il pH di un campione di ogni concentrazione e del controllo.

Concentrazione del test

Ai sensi del § 42 del metodo OECD 201:2006, è stata effettuata una prova alla concentrazione limite di 100 mg/L.

Condizioni di incubazione

La temperatura di incubazione è di $23\pm 2^{\circ}\text{C}$. È stato applicato un ciclo di luce bianca continua a 6000-10000 lux. I recipienti di prova non sono stati aerati durante il test e, quest'ultimo, è stato effettuato senza regolazione del pH.

I contenitori utilizzati sono chiusi in modo da evitare contaminazioni dell'aria e ridurre l'evaporazione dell'acqua, ma non sono ermetici, pertanto permettono alla CO_2 di entrare nel contenitore.

Ogni giorno, prima della lettura, tutti i contenitori sono stati agitati e capovolti un paio di volte, in maniera tale da mantenere le cellule in sospensione e per facilitare il trasferimento della CO_2 dall'aria all'acqua e a sua volta per ridurre la variazione del pH.

Misure

È stata misurata la densità cellulare in ogni contenitore (inclusi i controlli) ogni 24 ore. La misurazione viene fatta tramite lettura della densità ottica allo spettrofotometro, usando la lunghezza d'onda impostata a 670 nm.

La densità cellulare nominale è utilizzata come densità cellulare iniziale come da metodo.

Alla fine del test, viene misurato il pH di un campione di ogni concentrazione e del controllo.

Durata

La durata del test è stata di 72 ore, escluse le fasi di preparazione.

5. Dati grezzi

1° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 25/03/2021

Nel primo giorno dello studio è stato preparato l'estratto acquoso del campione come sopra descritto.

2° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 26/03/2021

Fine agitazione dell'eluizione. L'eluato è stato filtrato su filtri rapidi e poi su filtri con porosità 0,45 µm. Ad ogni contenitore di reazione è stato aggiunto 1 mL di coltura algale.

Lettura iniziale alga per determinare la concentrazione algale di partenza per ogni contenitore: D.O. = 0,040. L'equazione del lotto di alghe utilizzato per ricavare la concentrazione algale espressa in cellule/mL viene indicata dal fornitore ed è la seguente:

$$y = 1506634x - 53184$$

Quindi la concentrazione algale di partenza è risultata essere $7,081 \times 10^3$ cellule/mL.

Sono stati misurati i valori iniziali di pH e di ossigeno disciolto (Tab. 1).

Tab. 1: valori di pH e di ossigeno disciolto per le varie diluizioni testate e per il controllo all'inizio del test

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	8,39	9,41
100 mg/L	8,75	9,57

3° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 27/03/2021

Dopo 24 ore di esposizione, sono stati letti i valori di assorbanza di ogni contenitore (Tab. 2).

Tab. 2: valori di assorbanza per contenitore nelle 6 repliche dopo 24 ore.

Conc.	DO 1	DO 2	DO 3	DO 4	DO 5	DO 6	Media DO
Controllo	0,075	0,073	0,071	0,070	0,070	0,079	0,073
100 mg/L	0,080	0,079	0,078	0,080	0,080	0,086	0,081

Dopodiché, tutti i contenitori sono stati rimessi alle stesse condizioni per altre 24 ore di esposizione.

4° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 28/03/2021

Dopo altre 24 ore di esposizione, sono stati letti i valori di assorbanza di ogni contenitore (Tab. 3).

Tab. 3: valori di assorbanza per contenitore nelle 6 repliche dopo 48 ore.

Conc.	DO 1	DO 2	DO 3	DO 4	DO 5	DO 6	Media DO
Controllo	0,143	0,143	0,149	0,152	0,162	0,158	0,151
100 mg/L	0,163	0,164	0,169	0,170	0,173	0,172	0,169

5° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 29/03/2021

Dopo altre 24 ore di esposizione, sono stati letti i valori di assorbanza di ogni contenitore (Tab. 4).

Tab. 4: valori di assorbanza per contenitore nelle 6 repliche dopo 72 ore.

Conc.	DO 1	DO 2	DO 3	DO 4	DO 5	DO 6	Media DO
Controllo	0,633	0,768	0,685	0,692	0,732	0,687	0,700
100 mg/L	0,626	0,706	0,650	0,643	0,700	0,798	0,687

Sono stati registrati i valori finali di pH e di ossigeno disciolto a 72h (Tab. 5).

Tab. 5: valori di pH e di ossigeno disciolto per le varie diluizioni testate e per il controllo alla fine del test

Concentrazione	pH	Ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo	9,39	9,50
100 mg/L	8,02	9,46

6. Calcoli

Come primo passaggio è stata calcolata la densità cellulare, espressa in cellule/mL, per ogni valore di assorbanza letto nei tre giorni del test. A tal fine si è usata l'equazione della retta di regressione fornita dal produttore del kit, già riportata:

$$y = 1506634x - 53184$$

Una volta ottenute le concentrazioni algali, se ne calcola la media.

Tab. 6: concentrazioni algali e valori medi dopo 24h di incubazione nelle 6 repliche, espressi in cellule/mL, per il campione testato

Conc.	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Media conc.
Controllo	5,981E+04	5,680E+04	5,379E+04	5,228E+04	5,228E+04	6,584E+04	5,680E+04
100 mg/L	6,735E+04	6,584E+04	6,433E+04	6,735E+04	6,735E+04	7,639E+04	6,810E+04

Tab. 7: concentrazioni algali e valori medi dopo 48h di incubazione nelle 6 repliche, espressi in cellule/mL, per il campione testato

Conc.	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Media conc.
Controllo	1,623E+05	1,623E+05	1,713E+05	1,758E+05	1,909E+05	1,849E+05	1,746E+05
100 mg/L	1,924E+05	1,939E+05	2,014E+05	2,029E+05	2,075E+05	2,060E+05	2,007E+05

Tab. 8: concentrazioni algali e valori medi dopo 72h di incubazione nelle 6 repliche, espressi in cellule/mL, per il campione testato

Conc.	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6	Media conc.
Controllo	9,005E+05	1,104E+06	9,789E+05	9,894E+05	1,050E+06	9,819E+05	1,001E+06
100 mg/L	8,900E+05	1,010E+06	9,261E+05	9,156E+05	1,001E+06	1,149E+06	9,821E+05

Ponendo in un grafico di dispersione le misure di logaritmo naturale (ln) della densità cellulare (cellule/mL) rispetto alla concentrazione del campione testato e al tempo di misurazione, si sono tracciate le curve di crescita per la concentrazione limite e per il controllo. Una curva lineare indica che la crescita è esponenziale, mentre un livellamento indica che le colture sono entrate in fase stazionaria.

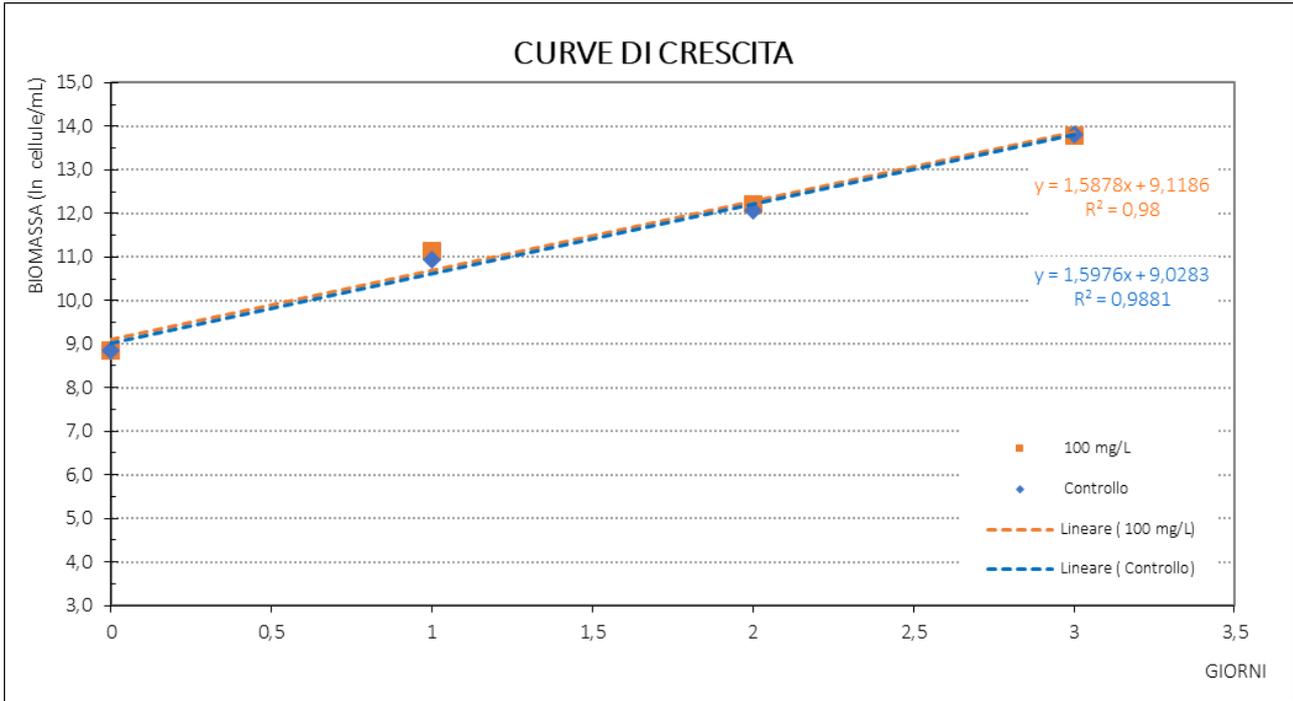


Fig. 1: curve di crescita algale a 72h della concentrazione limite e del controllo negativo. Biomassa in scala logaritmica (ln). La pendenza della retta rappresenta il tasso specifico di crescita (§44, OECD 201:2006).

Dopodiché si è calcolato il tasso di crescita specifico medio giornaliero, μ , per ogni coltura test, usando la seguente equazione:

$$\mu = \frac{\ln x_L - \ln x_0}{t_L - t_0}$$

Dove:

t_0 è il tempo di inizio del test

t_L è il tempo di fine del test (o il tempo dell'ultima misurazione durante il periodo di crescita esponenziale nelle colture di controllo)

x_0 è la densità cellulare nominale iniziale

x_L è la densità cellulare misurata al tempo t_L

Tab.9: tassi di crescita specifici del controllo e del campione per replica e per giorno

	Replica	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5	Rep. 6	Media	CV	CV%	$\%I_r$
$\mu_{i,j}$ 0-1	Controllo	2,13	2,08	2,03	2,00	2,00	2,23	2,08	0,091	4,4	-8,8
	100 mg/L	2,25	2,23	2,21	2,25	2,25	2,38	2,26	0,060	2,6	
$\mu_{i,j}$ 1-2	Controllo	1,00	1,05	1,16	1,21	1,30	1,03	1,12	0,117	10,4	3,8
	100 mg/L	1,05	1,08	1,14	1,10	1,13	0,99	1,08	0,055	5,1	
$\mu_{i,j}$ 2-3	Controllo	1,71	1,92	1,74	1,73	1,70	1,67	1,75	0,087	5,0	9,2
	100 mg/L	1,53	1,65	1,53	1,51	1,57	1,72	1,58	0,084	5,3	
$\mu_{i,j}$ medio	Controllo							1,65	0,016	1,0	

$\%I_r$ = percentuale di inibizione del tasso di riproduzione medio giornaliero

Confrontando i valori del tasso medio di crescita a 72h del bianco e delle concentrazioni testate, si può calcolare l'inibizione percentuale del tasso di crescita $\%I_r$ con la formula di cui al § 50 del metodo OECD 201:2006 (Tab. 10):

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

Dove:

$\%I_r$ è la percentuale di inibizione della media del tasso di crescita specifico

μ_C è il valore medio del tasso di crescita specifico medio del gruppo di controllo

μ_T è la media del tasso di crescita specifico della replica del trattamento T

6.2 Criteri di validità

Il test è da considerarsi valido, dato che:

- La biomassa del controllo a 72h rispetto all'inizio del test è risultata essere cresciuta di un fattore maggiore del 16 richiesto dal metodo (p.to 11 OECD 201:2006)
- il coefficiente medio di variazione section-by-section del tasso di crescita specifico nel controllo non eccede il 35% (p.to 11 della OECD 201:2006)
- il coefficiente di variazione del tasso di crescita medio del controllo durante l'intero test è inferiore al 7% (p.to 11 della OECD 201:2006)
- La CrE₅₀ a 72h della sostanza di riferimento bicromato di potassio (K₂Cr₂O₇) è accettabile (vedi Box 1)

BOX 1 CrE₅₀ della sostanza di riferimento: bicromato di potassio (K₂Cr₂O₇)

Tab. B1: valori di assorbanza (o densità ottica, DO) per la sostanza di riferimento dopo 24 ore nelle 3 repliche

Conc.	DO 1	DO 2	DO 3	Media DO
Controllo	0.090	0.100	0.108	0.099
0,18 mg/L	0.089	0.107	0.083	0.093
0,32 mg/L	0.087	0.083	0.084	0.085
0,56 mg/L	0.083	0.078	0.094	0.085
1,00 mg/L	0.076	0.069	0.069	0.071
1,80 mg/L	0.079	0.083	0.071	0.078

Tab. B2: valori di assorbanza (o densità ottica, DO) per la sostanza di riferimento dopo 48 ore nelle 3 repliche

Conc.	DO 1	DO 2	DO 3	Media DO
Controllo	0.322	0.350	0.375	0.349
0,18 mg/L	0.334	0.373	0.322	0.343
0,32 mg/L	0.374	0.334	0.357	0.355
0,56 mg/L	0.253	0.235	0.287	0.258
1,00 mg/L	0.091	0.092	0.084	0.089
1,80 mg/L	0.046	0.046	0.040	0.044

Tab. B2: valori di assorbanza (o densità ottica, DO) per la sostanza di riferimento dopo 72 ore nelle 3 repliche

Conc.	DO 1	DO 2	DO 3	Media DO
Controllo	0.322	0.350	0.375	0.349
0,18 mg/L	0.334	0.373	0.322	0.343
0,32 mg/L	0.374	0.334	0.357	0.355
0,56 mg/L	0.253	0.235	0.287	0.258
1,00 mg/L	0.091	0.092	0.084	0.089
1,80 mg/L	0.046	0.046	0.040	0.044

Lettura iniziale alga per determinare la concentrazione algale di partenza per ogni contenitore: D.O. = 0,040. L'equazione del lotto di alghe utilizzato (Algatokit Ecotox lotto SC260618) per ricavare la concentrazione algale espressa in cellule/ml viene indicata dal fornitore ed è la seguente:

$$y = 1325476x - 47874$$

Tab. B4: concentrazioni algali e valori medi nelle 3 repliche dopo 24h di incubazione, espressi in cells/mL

Conc.	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Media conc.
Controllo	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03
0,18 mg/L	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03
0,32 mg/L	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03
0,56 mg/L	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03
1,00 mg/L	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03
1,80 mg/L	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03	5.1E+03

Tab. B5: concentrazioni algali e valori medi nelle 3 repliche dopo 48h di incubazione, espressi in cells/mL

Conc.	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Media conc.
Controllo	7.142E+04	8.467E+04	9.528E+04	8.379E+04
0,18 mg/L	7.009E+04	9.395E+04	6.214E+04	7.540E+04
0,32 mg/L	6.744E+04	6.214E+04	6.347E+04	6.435E+04
0,56 mg/L	6.214E+04	5.551E+04	7.672E+04	6.479E+04
1,00 mg/L	5.286E+04	4.358E+04	4.358E+04	4.668E+04
1,80 mg/L	5.684E+04	6.214E+04	4.623E+04	5.507E+04

Tab. B6: concentrazioni algali e valori medi nelle 3 repliche dopo 72h di incubazione, espressi in cells/mL

Conc.	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Media conc.
Controllo	3.789E+05	4.160E+05	4.492E+05	4.147E+05
0,18 mg/L	3.948E+05	4.465E+05	3.789E+05	4.068E+05
0,32 mg/L	4.479E+05	3.948E+05	4.253E+05	4.227E+05
0,56 mg/L	2.875E+05	2.636E+05	3.325E+05	2.945E+05
1,00 mg/L	7.274E+04	7.407E+04	6.347E+04	7.009E+04
1,80 mg/L	1.310E+04	1.310E+04	5.145E+03	1.045E+04

Sono state tabulate le misure di densità cellulare rispetto alla concentrazione del campione testato e al tempo di misurazione. È stata tracciata una curva per ogni concentrazione test e per il controllo, come un grafico della media della densità cellulare contro il tempo. Una curva di crescita lineare indica una crescita esponenziale, mentre un livellamento indica che le colture sono entrate in fase stazionaria.

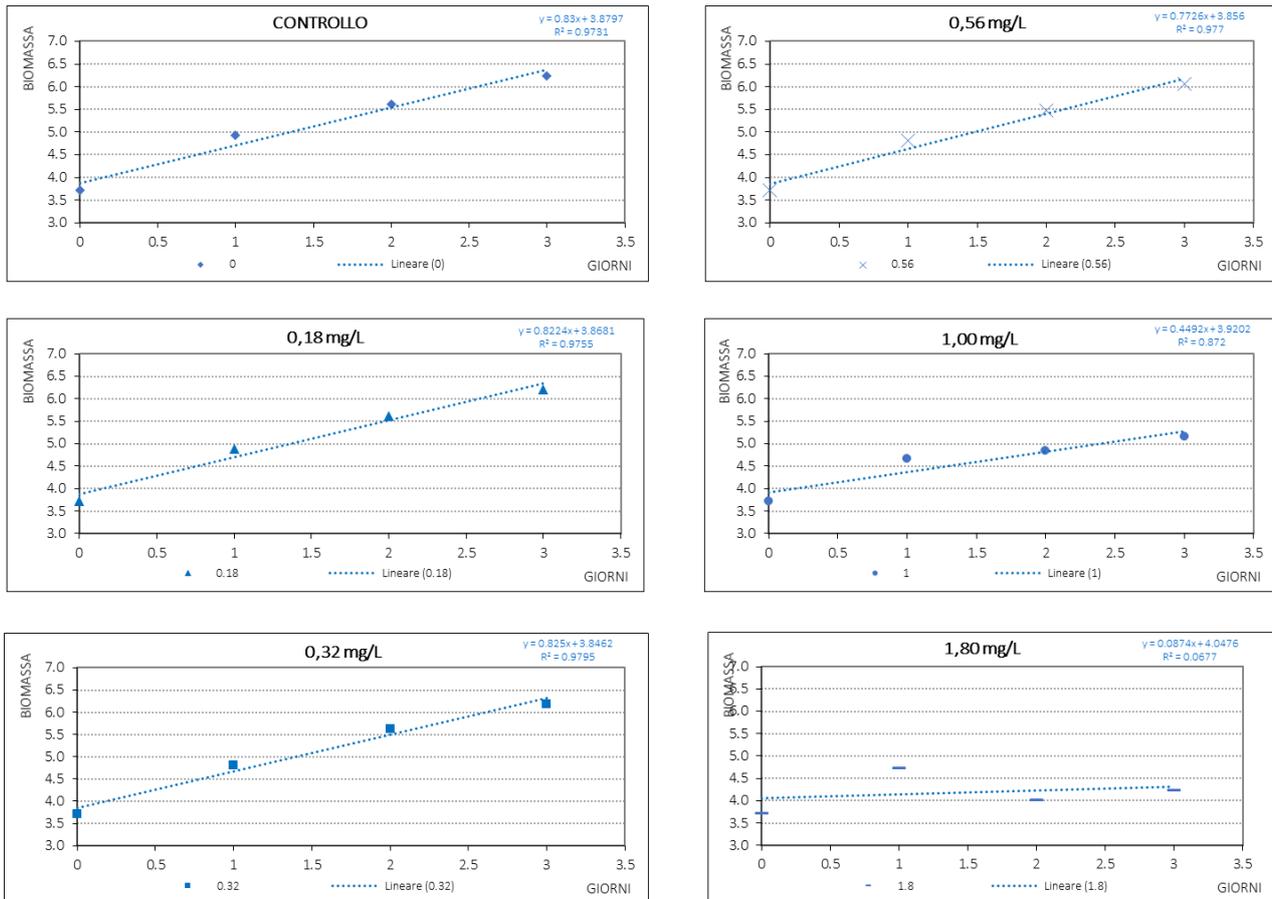


Fig. B1: curve di crescita algale alle varie concentrazioni testate del bicromato di potassio

Dopodiché si è calcolato il tasso di crescita specifico medio, μ , per ogni coltura test, usando la seguente equazione:

$$\mu = \frac{\ln x_L - \ln x_0}{t_L - t_0}$$

Dove:

t_0 è il tempo di inizio del test

t_L è il tempo di fine del test (o il tempo dell'ultima misurazione durante il periodo di crescita esponenziale nelle colture di controllo)

x_0 è la densità cellulare nominale iniziale

x_L è la densità cellulare misurata al tempo t_L

È stato calcolato poi il valore medio di μ per ogni replica dei gruppi test e del controllo. Da questi valori, è stata calcolata la percentuale di inibizione per ogni replica dei gruppi test, tramite la seguente equazione:

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100$$

Dove:

$I_{\mu i}$ è la percentuale di inibizione (tasso di crescita) per la concentrazione test i ;

μ_i è il tasso di crescita medio per la concentrazione test i ;

μ_c è il tasso di crescita medio per il controllo.

Tab. B7: tassi crescita specifica e % inibizione alle varie diluizioni della sostanza di riferimento

Tasso a 72h	Conc.	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Tasso medio	CV	CV%	%I _r
μ _j 0-3	Controllo	5.78	5.85	5.88	5.84	0.050	0.86	0.0
	0,18 mg/L	5.74	5.79	5.72	5.75	0.034	0.60	1.5
	0,32 mg/L	5.71	5.69	5.72	5.70	0.014	0.24	2.3
	0,56 mg/L	5.41	5.34	5.51	5.42	0.089	1.63	7.1
	1,00 mg/L	3.39	3.32	3.22	3.31	0.086	2.60	43.3
	1,80 mg/L	1.27	1.12	1.27	1.22	0.090	7.35	79.1

Infine, è stato realizzato il grafico dose inibizione. Mediante regressione logaritmica è stato trovato il valore di CrE₅₀ = **1,12 mg/L** in corrispondenza col valore %I_r = 50%, con intervallo di confidenza al 95% pari a **1,07-1,18 mg/L**. In base ai risultati del circuito inter-laboratorio a cui questi dati si riferiscono, il valore di accettabilità per la CrE₅₀ è 0,32-1,48 mg/L.

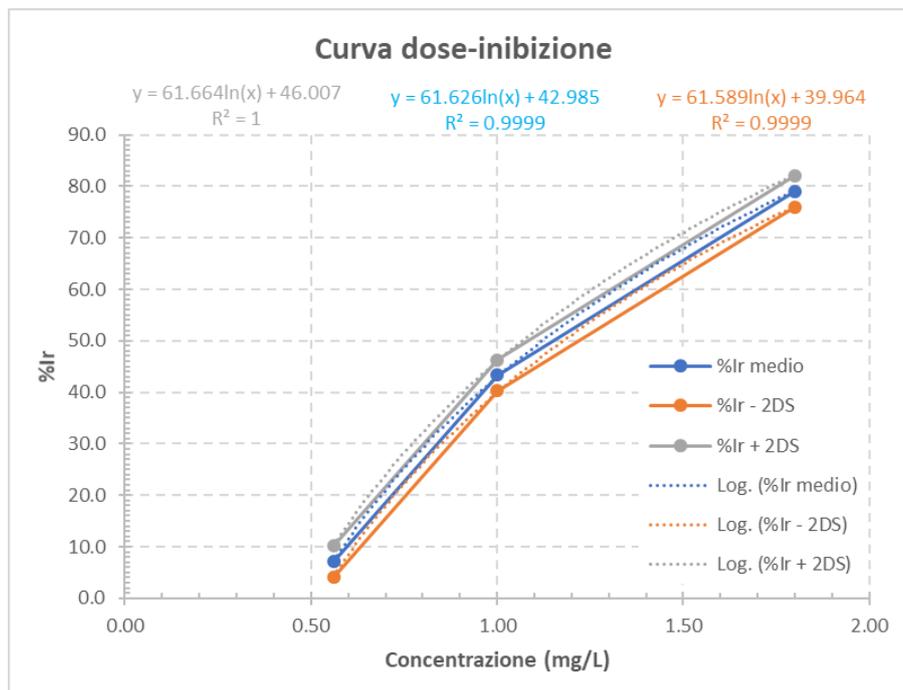


Fig. B2: curva dose-inibizione per il bicromato di potassio

7. Risultati e conclusioni

Tossicità acuta: CrE₅₀ > 100 mg/L

Dopo 72h di crescita alla concentrazione limite di 100 mg/L, il campione testato non ha influenza significativa sul tasso di crescita delle alghe rispetto al controllo. Pertanto, possiamo affermare che la CrE₅₀ a 72h (concentrazione alla quale avremo %I_r ≥ 50%) sarà maggiore di 100 mg/L.

Tossicità cronica: NOEC > 100 mg/L

Poiché la concentrazione limite testata non ha effetto statisticamente significativo, possiamo considerare che anche la NOEC (No Observed Effect Concentration) sia maggiore di 100 mg/L.

8. Archivi

La presente Relazione Tecnica e tutti i dati grezzi prodotti durante lo studio sono archiviati presso Lab-Control s.r.l.

9. Bibliografia

1. OECD/OCDE 201:2011 - OECD guideline for testing of chemicals – Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.
2. UNI EN ISO 8692:2005 - Prova di inibizione della crescita di alghe di acqua dolce per mezzo di alghe verdi unicellulari.
3. REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 DELLA COMMISSIONE del 30 maggio 2008 (testo consolidato 2017) 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) – Allegato Parte C, metodo C.3. Saggio di inibizione della crescita delle alghe.
4. UNI EN 14735:2005 - Caratterizzazione dei rifiuti. Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche.



STUDIO DI TOSSICITÀ CRONICA IN AMBIENTE ACQUATICO CON *DAPHNIA MAGNA STRAUS* (Concentrazione limite)

Campione in prova:

MPS CAMPIONE 3
(ID campione: 202104556)

Relazione Tecnica n.:

RT 210288 rev. 00
del 09/04/2021

Committente:

NEXTECO s.r.l.
Via Dei Quartieri, n. 45
36016 Thiene (VI)

STATO DELLE REVISIONI DEL DOCUMENTO

REV.	DATA	OGGETTO DELLA REVISIONE
00	09/04/2021	EMISSIONE DOCUMENTO

PROCEDIMENTO DI APPROVAZIONE

ESECUTORE PROVE		REDATTO		APPROVATO	
FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA
RESPONSABILE REPARTO ECOTOSSICOLOGIA	Tagliati Chiara	Vice DIRETTORE TECNICO	Zecchini Fulvio	DIRETTORE TECNICO	Pasi Manuela

Sommario

1. Riassunto	3
2. Obiettivo dello studio.....	3
3. Campione oggetto dello studio	3
4. Sperimentazione.....	3
4.1 Metodo di prova	3
4.2 Apparecchiatura utilizzata.....	3
4.3 Reagenti.....	4
4.4 Preparazione.....	4
4.5 Metodo di prova	4
5. Dati grezzi	5
6. Risultati.....	6
6.1 Analisi statistica dei dati	6
6.2 Criteri di validità della prova.....	7
7. Conclusioni	7
8. Archivi	7
9. Bibliografia.....	7

1. Riassunto

La presente Relazione Tecnica riassume in modo completo tutti i dati raccolti nel corso dello studio.

I giovani dafnidi, di età inferiore a 24 ore alla partenza della prova, sono esposti al campione di prova a concentrazione limite di 1 mg/L in 10 repliche con un singolo individuo progenitore, per 21 giorni. A intervalli regolari viene controllata la produzione di prole dei singoli progenitori e la mortalità nei vari contenitori. I valori ritrovati nei contenitori con il campione in prova vengono poi confrontati statisticamente col bianco rappresentato dal solo medium di allevamento.

2. Obiettivo dello studio

Lo scopo del presente studio in concentrazione limite è stato quello di valutare la tossicità cronica sul crostaceo d'acqua dolce *Daphnia magna* Straus, ovvero se il valore della NOEC (No Observed Effect Concentration) del campione in prova è superiore alla concentrazione limite (§ 36, OECD 211:2012) testata di 1 mg/L.

3. Campione oggetto dello studio

In data 17/03/2021, Lab-Control ha provveduto a prelevare presso il punto indicato dal committente il campione, denominato MPS CAMPIONE 3, e a trasportarlo in giornata al proprio laboratorio di prova, dove è stato identificato con l'ID 202104556.

Il campione, una volta ricevuto, è stato conservato sigillato, a temperatura refrigerata e al riparo dalla luce solare prima dell'esecuzione delle prove e verrà conservato nell'archivio campioni in tali condizioni per un mese dopo la fine dello studio.

4. Sperimentazione

4.1 Metodo di prova

Il presente studio fa riferimento al metodo "OECD/OCDE 211:2012 – OECD guideline for testing of chemicals – *Daphnia magna* Reproduction Test", riportato anche nel REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 metodo C.20. Prova di riproduzione con *Daphnia magna*.

4.2 Apparecchiatura utilizzata

- Piastre con pozzetti da 10 mL, con coperchio, in plastica per evitare processi di adsorbimento o di rilascio di sostanze che possono interferire con il saggio.
- Incubatore capaci di operare alla temperatura di $20 \pm 2^\circ\text{C}$.
- Lampade fluorescenti con illuminazione attenuata di circa 1500-2000 lux.
- Temporizzatore per il controllo del fotoperiodo.
- Ossimetro per la misurazione dell'ossigeno disciolto.
- pHmetro
- Normale vetreria di laboratorio.

4.3 Reagenti

Organismo test

Daphnia magna Straus è la specie sperimentale utilizzata (sub-allevamento come da indicazioni del metodo del lotto DM 121219, Daphtokit F magna, fornitore: Ecotox LDS). All'inizio della prova gli animali avevano meno di 24 ore di vita e, per ridurre la variabilità, non provenivano dalla prima nidiata e derivavano da un allevamento sano (senza segni di stress come alta mortalità, assenza di maschi e efippi, nessun ritardo nella produzione della prima nidiata, animali scoloriti assenti, ecc.). Gli animali sono stati mantenuti in condizioni di allevamento (luce, temperatura, mezzo) simili a quelle previste per la prova: la covata delle dafnie è stata mantenuta in acqua di diluizione alla temperatura di prova per almeno 48 ore prima dell'inizio del test.

Acqua di allevamento e di diluizione

Si usa un'acqua minerale che si è dimostrata idonea durante diverse prove nel nostro laboratorio all'allevamento delle dafnie (§§ 10 e 11 OECD 202:2004). Essa possiede le seguenti caratteristiche fondamentali per l'allevamento:

- Residuo fisso a 180 °C = 181,6 mg/L
- pH = 7,61
- Conducibilità elettrica specifica a 20°C = 297,6 µS/cm

4.4 Preparazione

Le concentrazioni testate sono state ottenute partendo da una soluzione madre con rapporto solido/liquido 1:10 S/L, preparata mediante lisciviazione del campione a granulometria = 4 mm con acqua di coltivazione secondo la norma UNI EN 14735:2005 (EC-1-2008) "Caratterizzazione di rifiuti - Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche". La soluzione è stata messa poi ad agitare con miscelatore a rovesciamento a 10 rpm per 24 h a 23°C. L'estratto acquoso è stato lasciato sedimentare per 15 minuti. Infine, è stato filtrato su membrana 0,45 µm prima di allestire la prova.

Il controllo negativo è composto dalla sola acqua di coltivazione.

4.5 Metodo di prova

Gruppi test e controlli

I contenitori di prova sono stati riempiti con 50 ml di acqua di diluizione e soluzioni del campione di prova; il rapporto di volume di aria/acqua nei recipienti è identico per prova e gruppi di controllo. Le dafnie sono state poi collocate nei recipienti di prova. Sono stati utilizzati, per ogni concentrazione e per i controlli, 10 animali, ciascuno in un suo contenitore.

Concentrazione del test

Ai sensi del § 36 dell'OECD 211:2012, il test è stato condotto alla concentrazione limite di 1 mg/L.

Condizioni di incubazione

La temperatura è rimasta nell'intervallo 20±1°C. È stato applicato un ciclo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. I recipienti di prova non sono stati aerati durante il test. Il test è stato effettuato senza regolazione del pH. I dafnidi sono stati alimentati giornalmente durante la prova con l'alga *Scenedesmus dimorphus* in quantità pari a 0.1 - 0.2 mg C/dafnia/giorno. Il medium di allevamento è stato cambiato ogni 2 giorni. Il pH nelle varie repliche si è mantenuto nell'intorno dell'intervallo di accettabilità da metodo (pH = 6-9), così come la concentrazione di ossigeno che deve essere > 3 mg/L.

Durata

La durata del test è stata di 21 giorni, dal 19/03/2021 al 09/04/2021, escluse le fasi di preparazione.

5. Dati grezzi

I dati grezzi sono riportati nelle due tabelle seguenti.

Tab. 1. Dati di riproduzione del controllo negativo (bianco)

Replica bianco	19/03/2021	22/03/2021	24/03/2021	26/03/2021	29/03/2021	31/03/2021	02/04/2021	06/04/2021	09/04/2021	Somma	Media	DS
1	0	0	0	0	31	52	23	40	53	199	39,8	22,9
2	0	0	0	0	32	37	0	60	2	131	26,2	22,6
3	0	0	0	0	36	51	0	42	44	173	34,6	23,1
4	0	0	0	0	21	52	32	16	45	166	33,2	20,6
5	0	0	0	23	41	0	44	55	35	198	39,6	22,5
6	0	0	0	0	30	43	0	76	0	149	29,8	27,5
7	0	0	0	0	24	33	0	63	5	125	25,0	22,1
8	0	0	0	0	45	0	43	44	35	167	33,4	22,2
9	0	0	0	0	31	43	0	58	0	132	26,4	23,0
10	0	0	0	0	37	0	25	3	0	65	13,0	13,8
Somma	0	0	0	23	328	311	167	457	219	1505	301	
Media	0,0	0,0	0,0	2,3	32,8	31,1	16,7	45,7	21,9	150,5	30,1	
DS	0,0	0,0	0,0	7,3	7,3	22,3	18,8	22,1	22,2			

Tab. 2. Dati di riproduzione del campione in concentrazione limite 1 mg/L.

Replica campione	19/03/2021	22/03/2021	24/03/2021	26/03/2021	29/03/2021	31/03/2021	02/04/2021	06/04/2021	09/04/2021	Somma	Media	DS
1	0	0	0	18	16	17	59	40	58	208	41,6	23,7
2	0	0	0	0	30	46	35	57	62	230	46,0	26,1
3	0	0	0	0	23	31	3	72	29	158	31,6	24,4
4	0	0	0	0	25	51	1	101	23	201	40,2	34,4
5	0	0	0	0	40	0	46	39	53	178	35,6	23,8
6	0	0	0	0	21	38	0	60	3	122	24,4	21,9
7	0	0	0	0	31	54	0	87	32	204	40,8	31,3
8	0	0	0	0	23	44	45	16	51	179	35,8	21,8
9	0	0	0	0	27	30	0	48	35	140	28,0	19,3
10	0	0	0	0	35	27	0	77	23	162	32,4	26,2
Somma	0	0	0	18	271	338	189	597	369	1782	356,4	
Media	0	0	0	1,8	27,1	33,8	18,9	59,7	36,9	178,2	35,6	
DS	0,0	0,0	0,0	5,7	7,1	16,6	24,2	25,3	18,7			

6. Risultati

6.1 Analisi statistica dei dati

Per l'analisi della normalità delle serie di dati delle medie di prole dei 10 replicati si è utilizzato il test di Shapiro-Wilk, con verifica di eventuali dati anomali mediante test di Huber, in caso di serie non normali. Sia le serie di dati del campione che quella del controllo sono risultate distribuite normalmente.

Per verificare se vi è un effetto alla concentrazione limite, la media di prole del campione è stata confrontata con quella del bianco attraverso i test statistici (§ 58; OECD 211:2012) di cui seguono i risultati.

Tab. 3: confronto statistico tra numerosità della prole del controllo e della concentrazione limite a fine test

Replica	Media bianco	Media campione
1	39,8	41,6
2	26,2	46,0
3	34,6	31,6
4	33,2	40,2
5	39,6	35,6
6	29,8	24,4
7	25,0	40,8
8	33,4	35,8
9	26,4	28,0
10	13,0	32,4
Media	30,1	35,6

Test F a due campioni per varianze		
	Media bianco	Media campione
Media	30,1	35,64
Varianza	63,61111111	44,64711111
Osservazioni	10	10
gdl	9	9
F	1,424753126	
P(F<=f) una coda	0,303213607	
F critico una coda	3,178893104	

Test t: due campioni assumendo uguale varianza		
	Media bianco	Media campione
Media	30,1	35,64
Varianza	63,61111111	44,64711111
Osservazioni	10	10
Varianza complessiva	54,12911111	
Differenza ipotizzata per le medie	0	
gdl	18	
Stat t	-1,683756632	
P(T<=t) una coda	0,054745357	
t critico una coda	1,734063607	
P(T<=t) due code	0,109490715	
t critico due code	2,10092204	

Per verificare se siamo in presenza di due serie con uguale varianza o meno, è stato usato l'apposito test F. Tramite Test t sono state confrontate le medie di prole nel campione a 1 mg/L e nel controllo negativo (bianco).

A seguito dei test statistici, risulta che non vi è differenza significativa tra le medie della dose testata e del controllo. Possiamo, quindi, affermare che alla concentrazione limite di 1 mg/L il campione non ha influenza sulla riproduzione di *Daphnia magna* Straus, ovvero avremo $CE_{50} > 1$ mg/L e $NOEC > 1$ mg/L.

6.2 Criteri di validità della prova

Nel test sono rispettati i parametri di validazione del test:

- per controllo e campione: mortalità dei progenitori $\leq 20\%$ alla fine del test;
- per il controllo: media dei figli prodotti per ciascun animale sopravvissuto alla fine del test ≥ 60 .

Sono inoltre rispettate tutte le condizioni ambientali richieste durante il test (temperatura, pH, concentrazione di O₂ ecc., Tab. 4).

Tab. 4: valori di pH e di ossigeno disciolto per le varie diluizioni testate e per il controllo all'inizio (t_0) e alla fine (t_{21}) del test

Concentrazione	pH _{t0}	[O ₂] _{t0} (mg/L)	pH _{t21}	[O ₂] _{t21} (mg/L)
Controllo	8,03	9,94	8,17	8,45
1 mg/L	7,87	9,94	9,07	8,32

7. Conclusioni

Tossicità cronica NOEC > 1 mg/L

Alla concentrazione limite di 1 mg/L il campione non ha effetto statisticamente significativo sulla riproduzione di *Daphnia magna* Straus. La NOEC (No Observed Effect Concentration) sarà quindi maggiore di 1 mg/L.

8. Archivi

La presente Relazione Tecnica e tutti i dati grezzi prodotti durante lo studio sono archiviati presso Lab-Control s.r.l.

9. Bibliografia

1. OECD/OCDE 211:2012 – OECD guideline for testing of chemicals – *Daphnia magna* Reproduction Test
2. REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 DELLA COMMISSIONE del 30 maggio 2008 (testo consolidato 2019) 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). Allegato C, C.20. Prova di riproduzione con *Daphnia magna*
3. UNI EN 14735:2005 (EC-1-2008) "Caratterizzazione di rifiuti - Preparazione di campioni di rifiuti per prove ecotossicologiche"



PROVA SULLE PIANTE TERRESTRI: EMERGENZA E CRESCITA DELLE PLANTULE (OECD 208:2006)

Campione in prova:
MPS CAMPIONE 3
 (Campione ID 202104556)

Relazione tecnica n.:
RT 201289 rev. 00
 del 07/04/2021

Committente:
NEXTECO s.r.l.
Via Dei Quartieri, n. 45
36016 Thiene (VI)

STATO DELLE REVISIONI DEL DOCUMENTO

REV.	DATA	OGGETTO DELLA REVISIONE
00	07/04/2021	EMISSIONE DOCUMENTO

PROCEDIMENTO DI APPROVAZIONE

ESECUTORE PROVE		REDDATTO		APPROVATO	
FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA
RESPONSABILE REPARTO ECOTOSSICOLOGIA	Tagliati Chiara	Vice DIRETTORE TECNICO	Zecchini Fulvio	DIRETTORE TECNICO	Pasi Manuela

Sommario

1. Riassunto	3
2. Obiettivo dello studio	3
3. Campione oggetto dello studio	3
4. Sperimentazione.....	3
4.1 Preparazione del campione.....	3
4.2 Condizioni di esecuzione	4
4.3 Validità del test.....	4
4.4 Strumentazione	4
4.5 Reagenti e materiali.....	4
5. Dati grezzi e calcoli	5
6. Risultati	6
7. Archivi	7
8. Bibliografia.....	7

1. Riassunto

La presente relazione tecnica riassume in modo completo tutti i dati raccolti nel corso dello studio, come la preparazione del campione prima del test, le condizioni di esposizione delle piante scelte e i risultati calcolati.

2. Obiettivo dello studio

La prova di fitotossicità sulle piante è stata eseguita secondo il metodo OECD 208:2006 "OECD Guidelines for the Testing of Chemicals - Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test", ripreso dal metodo C.31 "Prova sulle piante terrestri: emergenza delle plantule e crescita delle plantule" del Reg. CE 440/2008.

La presente prova di fitotossicità valuta gli effetti dell'esposizione alla sostanza chimica in esame contenuta nel terreno (o in un'altra matrice del suolo appropriata) sull'emergenza delle plantule e sulle fasi iniziali di crescita delle piante superiori. I semi sono messi a contatto con il terreno trattato con la sostanza chimica in esame, i cui effetti sono valutati generalmente 14-21 giorni dopo l'emergenza del 50% delle plantule nel gruppo di controllo. Gli endpoint misurati sono la valutazione visiva dell'emergenza delle plantule, il peso dei germogli secchi (in alternativa, il peso dei germogli freschi), nonché la valutazione degli effetti nocivi visibili su diverse parti della pianta. Tali misurazioni e osservazioni sono confrontate con quelle effettuate su piante di controllo non trattate.

Il test è qui eseguito in un'unica concentrazione limite (§ 4; OECD 208:2006). Pertanto, si valuterà se la CE_{50} (la concentrazione con effetto di riduzione del 50% della germinabilità e/o della biomassa formatasi) sia superiore rispetto alla concentrazione testata.

Gli effetti ecotossici sono stati valutati su due piante superiori, una monocotiledone e una dicotiledone:

- *Lepidium sativum* L. (crescione; dicotiledone Classe Magnoliopsida, Ordine Capparales, Famiglia Brassicaceae)
- *Hordeum vulgare* L. (orzo; monocotiledone Classe Liliopsida, Sottoclasse Commelinidae, Ordine Poales, Famiglia Poaceae).

3. Campione oggetto dello studio

In data 17/03/2021, Lab-Control ha provveduto a prelevare presso il punto indicato dal committente il campione, denominato MPS CAMPIONE 3, e a trasportarlo in giornata al proprio laboratorio di prova, dove è stato identificato con l'ID 202104556.

Il campione, una volta ricevuto, è stato conservato sigillato, a temperatura refrigerata e al riparo dalla luce solare prima dell'esecuzione delle prove e verrà conservato nell'archivio campioni in tali condizioni per un mese dopo la fine dello studio.

4. Sperimentazione

4.1 Preparazione del campione

I potenziali effetti negativi sulle piante vengono valutati sul campione, miscelato al substrato di riferimento (torba e sabbia silicea in rapporto 3:1 p/p), alla concentrazione limite di 1000 mg/kg (§25; OECD 208:2006). Per ciascuna delle due specie vegetali usate, ogni vaso è stato riempito con circa 200 g di miscela substrato+ campione (solo substrato per il controllo). Sulla superficie di 78,5 cm² sono stati seminati 5 semi (da metodo devono essere usati 3-10 semi per 100 cm²), coperti da un sottile strato di materiale inerte (sabbia silicea). Le prove sono state eseguite in quattro repliche. Prima di posizionare i vasi in incubatore, è stata aggiunta acqua in ogni vaso, in modo da raggiungere il 70-100% della capacità di ritenzione idrica.

4.2 Condizioni di esecuzione

Il test viene condotto nelle condizioni ambientali necessarie per la normale crescita delle piante, che vengono mantenute costanti grazie ad un adeguato e frequente monitoraggio (temperatura, umidità, luminosità ecc.). Durante il test sono state adottate le seguenti condizioni:

- temperatura: $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- umidità: $70\% \pm 25\%$
- fotoperiodo: 16 ore di luce / 8 ore di buio
- intensità luminosa: $350 \pm 50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$

Durante il periodo di incubazione le piante sono state osservate frequentemente per verificare l'eventuale presenza di mortalità o segni di fitotossicità.

Alla fine del test sono state valutate ed annotate la percentuale di germinazione e la biomassa di ciascun vaso del campione rispetto a quelle del controllo.

4.3 Validità del test

Il test viene considerato valido quando (§ 6, OECD 208:2006):

- la percentuale di germinazione nel gruppo di controllo è $\geq 70\%$ per le specie vegetali utilizzate;
- il gruppo di controllo non esibisce effetti fitotossici visibili (come clorosi, necrosi, appassimento, deformazioni fogliari ecc.);
- durante il test almeno il 90% delle piante germinate nel gruppo di controllo sopravvivono fino a fine test;
- tutti gli organismi provengono dalla stessa fonte;
- tutte le camere di crescita utilizzate sono identiche per condizioni di esposizione e per numero di vasi contenuti.

4.4 Strumentazione

Comune strumentazione di laboratorio e in particolare:

- Camere di crescita delle piante (incubatori)
- Lampade temporizzate per fotoperiodo
- Vasi in plastica per piante con diametro = 10 cm
- Bilancia analitica
- Essiccatore
- Normale vetreria da laboratorio
- Frigorifero per conservazione

4.5 Reagenti e materiali

Comuni materiali di laboratorio e in particolare:

- Acqua distillata
- Sabbia
- Torba
- Semi di crescione
- Semi di orzo

5. Dati grezzi e calcoli

1° giorno di studio - 19/03/2021

Preparazione del substrato di riferimento e semina del crescione e dell'orzo come sopra indicato.

4° giorno di studio - 23/03/2021

Il 50% dei semi del gruppo di controllo è risultato germinato sia su orzo che su crescione.

18° giorno di studio - 06/04/2021

Sono state raccolte le piante germogliate e sono stati verificati

- il numero di semi germinati su 5 totali,
- la biomassa totale a fresco (peso fresco),
- la biomassa totale e dopo essiccazione a 105 °C (peso secco).

I dati grezzi sono riportati nelle tabelle che seguono, dove P1 = tara, P2 = peso lordo fresco e P3 = peso lordo secco.

Per ogni concentrazione, è stata calcolata la percentuale di germinazione data dalla media dei semi germinati nel compost campione rispetto alla media di quelli germinati nel compost testimone (controllo):

$$\%G = \frac{(media\ n\ semi\ germinati)_{campione}}{(media\ n\ semi\ germinati)_{controllo}} \times 100$$

Analogamente si è proceduto alla valutazione della percentuale di biomassa (fresca o secca):

$$\%BIOMASSA = \frac{(media\ biomassa\ fresca\ o\ secca)_{campione}}{(media\ biomassa\ fresca\ o\ secca)_{controllo}} \times 100$$

Di seguito si riportano i dati grezzi e i valori, in percentuale rispetto al controllo, di germinazione e di biomassa fresca o secca, per le due piante valutate nel corso del presente studio.

		CRESCIONE				
		Peso (g)				
Controllo	N° germinati	P1	P2	P3	P. Fresco	P. Secco
prova 1	5	2,1645	2,3264	2,1761	0,1619	0,0116
prova 2	5	2,1414	2,2843	2,1510	0,1429	0,0096
prova 3	5	2,1573	2,3483	2,1711	0,1910	0,0138
prova 4	5	2,1489	2,3347	2,1608	0,1858	0,0119
Media	5				0,1704	0,0117
		Peso (g)				
Campione	N° germinati	P1	P2	P3	P. Fresco	P. Secco
prova 1	3	2,1646	2,2870	2,1719	0,1224	0,0073
prova 2	3	2,1578	2,2520	2,1649	0,0942	0,0071
prova 3	4	2,1532	2,2955	2,1625	0,1423	0,0093
prova 4	4	2,1310	2,2694	2,1405	0,1384	0,0095
Media	3,5				0,1243	0,0083
Percentuali	70,0				73,0	70,8

		ORZO						
		Peso (g)						
Controllo	N° germinati	P1	P2	P3	P. Fresco	P. Secco		
prova 1	5	2,1359	3,9184	2,2799	1,7825	0,1440		
prova 2	5	2,1652	4,1177	2,3212	1,9525	0,1560		
prova 3	5	2,1416	3,9136	2,2761	1,7720	0,1345		
prova 4	5	2,1623	4,2838	2,3346	2,1215	0,1723		
Media	5				1,9071	0,1517		
		Peso (g)						
Campione	N° germinati	P1	P2	P3	P. Fresco	P. Secco		
prova 1	5	2,1535	3,9202	2,2904	1,7667	0,1369		
prova 2	3	2,1506	3,2106	2,2839	1,0600	0,1333		
prova 3	4	2,1586	3,5717	2,2930	1,4131	0,1344		
prova 4	5	2,1594	4,0674	2,2905	1,9080	0,1311		
Media	4,3				1,5370	0,1339		
Percentuali	85,0				80,6	88,3		

6. Risultati

Nelle due tabelle seguenti sono riportati le medie dei valori e l'intervallo di confidenza al 95%. I risultati vanno valutati in termini di germinabilità e peso secco (o in alternativa peso fresco) espressi come percentuale rispetto al controllo.

Crescione a 1000 mg/kg

Valori	Germinati (%)	Peso Fresco (%)	Peso Secco (%)
prova 1	60,0	71,8	62,3
prova 2	60,0	55,3	60,6
prova 3	80,0	83,5	79,3
prova 4	80,0	81,2	81,0
media	70,0	73,0	70,8
DS	11,5	12,8	10,9
Min (media-2DS)	46,9	49,9	47,7
Max (media+2DS)	93,1	96,1	93,9

Di conseguenza, poiché tutte le percentuali calcolate sono superiori al 50%, si può affermare che:

- per la germinabilità $CE_{50} > 1000 \text{ mg/kg}$
- per la biomassa (peso secco) $CE_{50} > 1000 \text{ mg/kg}$
- per la biomassa (peso fresco) $CE_{50} > 1000 \text{ mg/kg}$

Orzo a 1000 mg/kg

Valori	Germinati (%)	Peso Fresco (%)	Peso Secco (%)
prova 1	100,0	92,6	90,2
prova 2	60,0	55,6	87,9
prova 3	80,0	74,1	88,6
prova 4	100,0	100,0	86,4
media	85,0	80,6	88,3
DS	19,1	19,9	1,6
Min (media-2DS)	46,7	42,3	50,0
Max (media+2DS)	123,3	118,9	126,6

Di conseguenza, poiché tutte le percentuali calcolate sono superiori al 50%, si può affermare che:

- per la germinabilità $CE_{50} > 1000 \text{ mg/kg}$
- per la biomassa (peso secco) $CE_{50} > 1000 \text{ mg/kg}$
- per la biomassa (peso fresco) $CE_{50} > 1000 \text{ mg/kg}$

La prova è da considerarsi valida, in quanto sono rispettate tutte le condizioni di validità di cui al § 4.3.

7. Archivi

La presente Relazione Tecnica, il registro attività e tutti i dati grezzi prodotti durante lo studio sono archiviati presso Lab-Control s.r.l.

8. Bibliografia

- OECD/OCDE 208:2006 “OECD guideline for testing of chemicals – Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test”
- REGOLAMENTO (CE) 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) – Allegato Parte C, metodo C.31 “Prova sulle piante terrestri: emergenza delle plantule e crescita delle plantule”