

Livorno, 11/07/2022

Prot. 103/22

Spett.le CHEMSERVICE

Oggetto: risultati test di tossicità su matrice acquosa

Si trasmettono i risultati del test di tossicità acuta effettuato con *Acartia tonsa*.

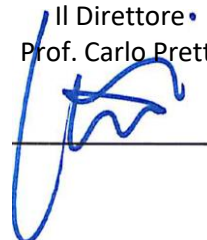
Le specifiche dei campioni analizzati sono riportate nella seguente tabella:

Codice CIBM	Codice campione	Data accettazione	Rif. Interno CIBM
2088-22	A_1 - 2201406-001	28/06/2022	S.A. 73-22
2089-22	A_2 - 2201406-002	28/06/2022	S.A. 73-22
2090-22	A_3 - 2201406-003	28/06/2022	S.A. 73-22
2091-22	A_4 - 2201406-004	28/06/2022	S.A. 73-22
2092-22	A_5 - 2201406-005	28/06/2022	S.A. 73-22

Nelle pagine successive si riporta, inoltre delle considerazioni circa la tossicità delle matrici acquose.

Cordiali saluti

Il Direttore •
Prof. Carlo Pretti



Capitolo 1 – Materiali e metodi

Metodiche impiegate per i saggi

Saggio di tossicità acuta con *Acartia tonsa* a 24 e 48 ore: UNICHIM 2365 (2012). Per l'allestimento del saggio sono state utilizzate uova di *A. tonsa* raccolte entro le 72 dall'allestimento del test da ceppo di laboratorio. Tossico di riferimento: $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Il valore di EC50 con il tossico di riferimento è risultato pari a 0,030 mg Ni^{2+}/L (0,020-0,050) a 24 h di esposizione, e a 0,029 mg Ni^{2+}/L (0,013-0,041) a 48 h di esposizione.

In tabella 1 si riportano i valori di Salinità, pH e ossigeno disciolto misurati sul campione tal quale prima dell'inizio dei test.

Tabella 1: Salinità, pH e ossigeno disciolto dei campioni saggiati e relativo controllo metodologico

Sigla campione	Salinità (%)	pH	Ossigeno disciolto (mg/l)
Controllo metodologico	30	8,07	6,52
2088-22	39	7,04	6,41
2089-22	38	6,51	6,72
2090-22	38	6,86	7,01
2091-22	38	6,98	6,54
2092-22	36	6,97	6,39

Capitolo 2 – Risultati

Saggio di tossicità acuta con *Acartia tonsa* a 24 e 48 ore

Nelle tabelle 2 e 3 sono mostrati i risultati relativi al saggio di tossicità acuta con *A. tonsa*. Il test è risultato valido secondo i limiti di accettabilità del test riportati nella nota in calce alla tabella. Non si osservano effetti di tossicità acuta, in termini di immobilizzazione dei naupli, rispetto al controllo in nessuno dei campioni testati. La massima concentrazione saggiata è stata 85% a causa dei limiti di salinità previsti per una corretta schiusa delle uova ($30\% \pm 2$). Tutti i campioni testati non hanno evidenziato percentuali di immobilizzazione dei naupli significativamente maggiori rispetto al controllo, sia a 24 che a 48 ore di esposizione. Dati i risultati ottenuti non è stato possibile calcolare i valori di EC20 e/o di EC50 e pertanto la tossicità risulta assente.

Tabella 2: test con copepodi (*A. tonsa*) a 24 h eseguito su campioni diluiti (max conc. testata 85%)

Campione Max. Conc.	Massima concentrazione saggiata (%)	Media % naupli mobili (± D.S.)			Media % naupli immobili (± D.S.)		
Controllo metodologico	-	100,00	±	0,00	0,00	±	0,00
2088-22	85	93,33	±	0,58	6,67	±	0,58
2089-22	85	96,67	±	0,58	3,33	±	0,58
2090-22	85	93,33	±	0,58	6,67	±	0,58
2091-22	85	93,33	±	0,58	6,67	±	0,58
2092-22	85	96,67	±	0,58	3,33	±	0,58

Tabella 3: test con copepodi (*A. tonsa*) a 48 h

Campione Max. Conc.	Massima concentrazione saggiata (%)	Media % naupli mobili (± D.S.)			Media % naupli immobili (± D.S.)		
Controllo metodologico	-	93,33	±	0,58	6,67	±	0,58
2088-22	85	93,33	±	0,58	6,67	±	0,58
2089-22	85	90,00	±	0,00	10,00	±	0,00
2090-22	85	93,33	±	0,58	6,67	±	0,58
2091-22	85	90,00	±	0,00	10,00	±	0,00
2092-22	85	96,67	±	0,58	6,67	±	0,58

Limiti di accettabilità del saggio:

- percentuale di immobilizzazione dei naupli nel controllo metodologico < 20%.

Considerazioni conclusive

Il saggio di tossicità acuta con *Acartia tonsa* effettuato sui campioni selezionati non hanno mostrato criticità ecotossicologiche alla massima concentrazione utilizzata.

Livorno, 11/07/2022

Prot. 44/22

Spett.le CHEMSERVICE

Oggetto: risultati test di tossicità su sedimento

Si trasmettono i risultati dei test di tossicità effettuati con *Corophium orientale*.

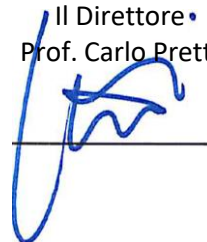
Le specifiche dei campioni analizzati sono riportate nella seguente tabella:

Codice CIBM	Codice campione	Data accettazione	Rif. Interno CIBM
1765-22	A1	19/05/2022	S.A. 56-22
1766-22	A2	19/05/2022	S.A. 56-22
1767-22	A3	19/05/2022	S.A. 56-22
1768-22	A4	19/05/2022	S.A. 56-22
1769-22	A5	19/05/2022	S.A. 56-22

Nelle pagine successive si riporta, inoltre delle considerazioni circa la tossicità dei sedimenti.

Cordiali saluti

Il Direttore •
Prof. Carlo Pretti



Capitolo 1 – Materiali e metodi

Metodiche impiegate per i saggi

Saggio di mortalità con *Corophium orientale* a 10 giorni di esposizione: ISO 16712 (2005). Per l'allestimento del saggio sono state utilizzati individui di *C. orientale*, con una taglia compresa nel range 500-750 µm, raccolti in campo ed acclimatati in laboratorio alle condizioni di esecuzione del test (salinità 36, temperatura 15±2 °C). Tossico di riferimento: CdCl₂. Il valore di EC50 ottenuto con il tossico di riferimento è pari a 3,2 mg/L (2,75-3,33) a 96 h di esposizione.

In tabella 1 si riportano i valori di salinità, pH, NH⁴⁺ e ossigeno disciolto (% di saturazione) misurati su campioni allestiti in camera di test.

Tabella 1: Temperatura, salinità, pH, NH⁴⁺ e ossigeno disciolto (% di saturazione) dei campioni sottoposti a prova, all'inizio (T0) e al termine dell'esposizione (T10)

Campione	Codice Interno CIBM	T0				T10			
		Salinità (‰)	pH	NH ⁴⁺ (mg/L)	Ossigeno disciolto (%)	Salinità (‰)	pH	NH ⁴⁺ (mg/L)	Ossigeno disciolto (%)
	Controllo	36	8,09	0-0,5	>85	36	8,12	0-0,5	>85
A1	1765-22	36	8,11	2-3	>85	36	8,34	0-0,5	>85
A2	1766-22	36	8,05	2	>85	36	8,35	2	>85
A3	1767-22	36	8,10	2	>85	36	8,27	1-2	>85
A4	1768-22	36	8,08	2-3	>85	36	8,26	0-0,5	>85
A5	1769-22	36	8,09	3-5	>85	36	8,28	0,5	>85

Capitolo 2 – Risultati

Saggio di mortalità con *Corophium orientale* a 10 giorni di esposizione

Nelle tabella 2 sono mostrati i risultati relativi al saggio di mortalità con *C. orientale*. In generale i campioni di sedimento hanno evidenziato percentuali di effetto inferiori al 15%, indicando un'assenza di tossicità. Tuttavia, nel campione 1769-22 (A5) è stata osservata una mortalità media del 17%. A tale campione è stata quindi attribuita una bassa tossicità nei confronti di *C. orientale*.

Tabella 2: test con *C. orientale* a 10 h eseguito su campioni di sedimento intero

Campione	Sopravvivenza % media (\pm D.S.)			Mortalità % media (\pm incertezza)			Mortalità % media corretta
Controllo metodologico	100	\pm	0,00	0	\pm	0,00	0
1765-22	86	\pm	5,16	14	\pm	8,21	14
1766-22	89	\pm	2,00	11	\pm	3,18	11
1767-22	94	\pm	2,31	6	\pm	3,67	6
1768-22	86	\pm	5,16	14	\pm	8,21	14
1769-22	83	\pm	3,83	17	\pm	6,09	17

Considerazioni conclusive

Il saggio di mortalità con *C. orientale* effettuato sui campioni di sedimento intero selezionati non ha evidenziato criticità ecotossicologiche, ad eccezione di una bassa tossicità osservata sul campione 1769-22 (A5)

Saggio di tossicità acuta su *Daphnia magna*

Si trasmettono i risultati dei test di tossicità acuta su *Daphnia magna* svolti sugli elutriati (tabella 2) preparati dai campioni di suolo così come ricevuti (tabella 1).

Identificativo dei campioni

Tabella 1: Identificazione campioni di suolo

Nome campione	Suolo S_1	Suolo S_2	Suolo S_3b	Suolo S_4b
Codice campione Chemservice	2201416-001	2201416-002	2201416-003	2201416-004
Data di campionamento	17/05/2022	17/05/2022	17/05/2022	17/05/2022
Data di ricevimento in laboratorio	20/05/2022	20/05/2022	20/05/2022	20/05/2022
Quantità	~30 kg	~30 kg	~30 kg	~30 kg
Contenitore	Secchio plastica	Secchio plastica	Secchio plastica	Secchio plastica

Tabella 2: identificazione campioni di elutriati da suolo

Nome campione	Elutriato S_1	Elutriato S_2	Elutriato S_3b	Elutriato S_4b
Codice interno Chemservice	E_2201416-001	E_2201416-002	E_2201416-003	E_2201416-004
Data di preparazione	26/05/2022	26/05/2022	26/05/2022	26/05/2022
Scadenza	24 h dallo scongelamento	24 h dallo scongelamento	24 h dallo scongelamento	24 h dallo scongelamento
Quantità	~250 mL	~250 mL	~250 mL	~250 mL

Metodiche impiegate per i saggi

La preparazione dell'elutriato a partire dai suoli campionati viene effettuata utilizzando il metodo descritto nella UNI EN 12457-2:2004 "Characterisation of waste; Leaching – Compliance test for leaching of granular waste materials and sludges".

Il test di tossicità acuta su *Daphnia magna* sui campioni di elutriato è stato condotto seguendo il metodo descritto nella linea guida OECD 202 "Daphnia sp., Acute Immobilization Test.", utilizzando organismi provenienti dall'allevamento interno al laboratorio, acquistati originariamente da MicroBioTests Inc., con sede in Belgio nel dicembre del 2011 (numero di batch: DM290911).

Condizioni del test:

Durata dello studio:	48 ore
Fotoperiodo:	16 ore di luce / 8 ore di buio
Intensità luminosa:	tra 1000 e 1500 Lux
Temperatura:	tra 18 e 22 °C (conforme al range raccomandato dalla OECD 202, 2004)

Risultati

Il saggio di tossicità su *Daphnia magna* è stato condotto sui campioni tal quale (TQ) senza ricostituzione della soluzione.

Tabella 3: valori di pH all'inizio e alla fine del test

Diluizione del campione	Valori pH Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo negativo	7.94 - 8.21
E2201416-001	7.83 – 8.18
E2201416-002	8.16 – 8.05
E2201416-003	7.94 – 8.07
E2201416-004	8.08 – 8.08

(conformi al range raccomandato 6 – 9 (OECD 202, 2004))

Tabella 4: valori della concentrazione di O2 disciolto all'inizio e alla fine del test

Diluizione del campione	Valori (mg/L) Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo negativo	6.98 – 7.03
E2201416-001	5.74 – 6.51
E2201416-002	5.81 – 6.43
E2201416-003	5.51 – 6.41
E2201416-004	5.27 – 6.34

(conformi al range raccomandato ≥ 3 mg/L OECD 202, 2004)

Tabella 5: Risultati biologici di immobilizzazione alle 24h e 48h

Tempo di esposizione (h)	Campione	Organismi esposti	Organismi immobilizzati	Percentuale di immobilizzazione (%)
24	Controllo neg.	20	0	0
	E2201416-001	20	0	0
	E2201416-002	20	0	0
	E2201416-003	20	0	0
	E2201416-004	20	0	0
48	Controllo neg.	20	0	0
	E2201416-001	20	0	0
	E2201416-002	20	0	0
	E2201416-003	20	0	0
	E2201416-004	20	0	0

NOTA: dopo 48 ore di esposizione le soluzioni appaiono limpide con una colorazione marrone.

Criteria di validità del test:

Il test è considerato valido perchè:

- Nel controllo negativo l'immobilizzazione delle dafnie non ha superato il 10%
- Il pH non è variato variare più di 1.5 unità al termine del test
- La concentrazione dell'ossigeno disciolto era ≥ 3 mg/l alla fine del saggio

Tabella 6: Risultati dell'endpoint: Immobilizzazione

Valore ricercato	2201416-001	2201416-002	2201416-003	2201416-004
EC ₅₀	>TQ (>100%)	>TQ (>100%)	>TQ (>100%)	>TQ (>100%)

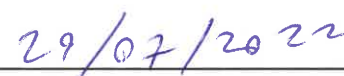
EC₅₀ = la concentrazione calcolata di sostanza test che causa l'immobilizzazione del 50% degli organismi esposti.

Conclusioni

In base ai test ecotossicologici effettuati sui campioni di lisciviato non si è evidenziato un effetto tossico su *D. magna* per tutti i campioni indagati.

Firma del tecnico


Stefano Ceriati


Data

Saggio di tossicità acuta su *Eisenia fetida*

Si trasmettono i risultati dei test di tossicità acuta su *Eisenia fetida* svolti sui campioni di suolo così come ricevuti (tabella 1).

Identificativo dei campioni

Tabella 1: Identificazione campioni di suolo

Nome campione	Suolo S_1	Suolo S_2	Suolo S_3b	Suolo S_4b
Codice campione Chemservice	2201416-001	2201416-002	2201416-003	2201416-004
Data di campionamento	17/05/2022	17/05/2022	17/05/2022	17/05/2022
Data di ricevimento in laboratorio	20/05/2022	20/05/2022	20/05/2022	20/05/2022
Quantità	~30 kg	~30 kg	~30 kg	~30 kg
Contenitore	Secchio plastica	Secchio plastica	Secchio plastica	Secchio plastica

Metodiche impiegate per i saggi

Il test di tossicità acuta su *Eisenia fetida* è stato condotto seguendo il metodo descritto nella linea guida OECD 207, 1984, utilizzando organismi provenienti da Bias Labs Ltd.

Condizioni del test:

Durata dello studio: 14 giorni
 Fotoperiodo: 24 ore di luce
 Intensità luminosa: tra 400 e 800 Lux
 Temperature dello studio: 20 ± 2°C;
 (conforme al range raccomandato dalla OECD 207,1984)

Risultati

I quattro saggi di tossicità acuta su *Eisenia fetida* sono stati condotti sul campione tal quale (TQ) con aggiunta di acqua deionizzata al fine di ottenere un'umidità del terreno di circa il 40% della WHC (Maximum Water Holding Capacity) del campione setacciato a < 4mm

Tabella 2: WHC dei campioni espressa in % di peso secco

Tipologia di suolo	Valori WHC (%)	umidità da ottenere (%) (40% della WHC)
2201416-001	73.8	29.5
2201416-002	87.9	35.2
2201416-003	78.5	31.4
2201416-004	88.6	35.4

Tabella 3: valori di pH e umidità all'inizio e alla fine del test

Tipologia di suolo	Valori pH Inizio test – fine test (media delle repliche)	Valori umidità (%) Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo negativo	6.02 – 6.31	38.0 – 35.2
2201416-001	7.71 – 7.35	28.8 – 24.1
2201416-002	7.72 – 8.01	32.9 - 27.5
2201416-003	8.06 – 8.11	29.0 – 25.5
2201416-004	7.78 – 7.98	36.3 – 29.4

Criteri di validità del test:

Il test è considerato valido in quanto:

- Alla fine del test, la mortalità degli organismi nel controllo negativo non ha superato il 10%.

Tabella 4: Risultati biologici di mortalità

Tempo di esposizione (giorni)	Campione	Organismi morti / Organismi esposti				Totale morti/ Totale esposti	Percentuale di mortalità (%)
		A	B	C	D		
14	Controllo neg.	0/10	0/10	0/10	0/10	0/40	0
	2201416-001	1/10	0/10	0/10	0/10	1/40	2.5
	2201416-002	0/10	0/10	0/10	0/10	0/40	0
	2201416-003	0/10	0/10	0/10	0/10	0/40	0
	2201416-004	0/10	0/10	0/10	0/10	0/40	0

Alla luce dei risultati ottenuti, gli endpoint si ricavano i seguenti endpoint:

Tabella 5: Risultati dell'endpoint: Mortalità

Valore ricercato	2201416-001	2201416-002	2201416-003	2201416-004
NOEC	TQ (100%)	TQ (100%)	TQ (100%)	TQ (100%)
LOEC	>TQ (>100%)	>TQ (>100%)	>TQ (>100%)	>TQ (>100%)
LC ₅₀	>TQ (>100%)	>TQ (>100%)	>TQ (>100%)	>TQ (>100%)

NOEC = concentrazione di effetto statisticamente non significativo

LOEC = la più bassa concentrazione ad avere un effetto significativo sugli organismi

LC₅₀ = la concentrazione calcolata di sostanza test che causa la mortalità del 50% degli organismi esposti.

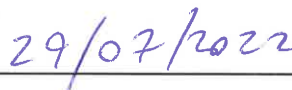
Conclusioni

In base ai test ecotossicologici effettuati sui campioni di lisciviato non si è evidenziato un effetto tossico statisticamente significativo su *E. fetida* per tutti i campioni indagati.

Firma del tecnico



Stefano Ceriati



Data

SAGGIO DI GENOTOSSICITA'

Si trasmettono i risultati dei test di genotossicità effettuato sui campioni di acqua marina (tabella 1) e sugli elutriati (tabella 3) ottenuti dai campioni di suolo (tabella 2) così come ricevuti.

Identificativo dei campioni

Tabella 1: Identificazione campioni di acqua

Nome campione	Acqua marina A_1	Acqua marina A_2	Acqua marina A_3	Acqua marina A_4	Acqua marina A_5
Codice campione ChemService	2201406-001	2201406-002	2201406-003	2201406-004	2201406-005
Data di campionamento	17/05/2022	17/05/2022	17/05/2022	17/05/2022	17/05/2022
Data di ricevimento in laboratorio	19/05/2022	19/05/2022	19/05/2022	19/05/2022	19/05/2022
Quantità	~2000 mL	~2000 mL	~2000 mL	~2000 mL	~2000 mL
Contenitore	Bottiglia in HDPE	Bottiglia in HDPE	Bottiglia in HDPE	Bottiglia in HDPE	Bottiglia in HDPE

Tabella 2: Identificazione campioni di suolo

Nome campione	Suolo S_1	Suolo S_2	Suolo S_3b	Suolo S_4b
Codice campione Chemservice	2201416-001	2201416-002	2201416-003	2201416-004
Data di campionamento	17/05/2022	17/05/2022	17/05/2022	17/05/2022
Data di ricevimento in laboratorio	20/05/2022	20/05/2022	20/05/2022	20/05/2022
Quantità	~30 kg	~30 kg	~30 kg	~30 kg
Contenitore	Secchio plastica	Secchio plastica	Secchio plastica	Secchio plastica

Tabella 3: identificazione campioni di elutriati da suolo

Nome campione	Elutriato S_1	Elutriato S_2	Elutriato S_3b	Elutriato S_4b
Codice interno Chemservice	E_2201416-001	E_2201416-002	E_2201416-003	E_2201416-004
Data di preparazione	26/05/2022	26/05/2022	26/05/2022	26/05/2022
Scadenza	24 h dallo scongelamento	24 h dallo scongelamento	24 h dallo scongelamento	24 h dallo scongelamento
Quantità	~250 mL	~250 mL	~250 mL	~250 mL

Metodiche impiegate per i saggi

I campioni di acqua marina sono stati congelati a -20°C all'arrivo in laboratorio. Per lo scongelamento si è utilizzata la procedura descritta nella linea guida UNI EN ISO 5667-16.

La preparazione dell'elutriato a partire dai suoli campionati viene effettuata utilizzando il metodo descritto nella UNI EN 12457-2:2004 "Characterisation of waste; Leaching – Compliance test for leaching of granular waste materials and sludges".

Il test di mutagenesi batterica, noto anche come test di Ames, svolto sui campioni di acque marine e sui campioni di elutriato dei suoli, è stato eseguito nella modalità a fluttuazione liquida in micropiastra con 2 ceppi di *Salmonella typhimurium* utilizzando kit forniti da Xenometrix AG, Switzerland.

In parallelo ai campioni ambientali sono stati condotti saggi con sostanze mutagene di riferimento che fungono da controllo positivo, utili per verificare la corretta sensibilità dei ceppi batterici utilizzati e le idonee condizioni sperimentali.

Risultati

Di seguito vengono riportati i risultati ottenuti per i campioni di acqua marina, espressi come Fold Induction.

La Fold Induction si considera positiva, quindi il trattamento è mutageno, quando è maggiore o uguale a 2. In caso di campioni testati a concentrazioni multiple, la fold induction deve essere dose dipendente ed essere maggiore di 2.

Acqua marina

Tabella 4: risultati di genotossicità delle acque marine espressa come Fold Induction

Ceppo	TA 98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
Campione	-S9	+S9	-S9	+S9
Controllo positivo	41.57	26.36	3.91	4.69
2201406-001	1.00	1.28	1.00	1.04
2201406-002	1.00	1.10	1.00	1.01
2201406-003	1.15	1.00	1.00	1.11
2201406-004	1.15	1.00	1.00	1.00
2201406-005	1.00	1.00	1.00	1.14

Tutti i campioni risultano non mutageni nelle condizioni sperimentali del presente saggio, sia in presenza che assenza di attivazione metabolica.

Elutriato del Suolo

Di seguito vengono riportati i risultati ottenuti per i campioni di sedimento espressi come Fold Induction.

Tabella 42: risultati di genotossicità sugli elutriati espressa come Fold Induction

Ceppo	TA 98		TA100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
Campione	-S9	+S9	-S9	+S9
Controllo positivo	5.41	4.47	6.02	4.32
E2201416-001	1.17	1.00	1.00	1.00
E2201416-002	1.00	1.00	1.00	1.00
E2201416-003	1.00	1.00	1.00	1.00
E2201416-004	1.33	1.00	1.00	1.00

Tutti i campioni risultano non mutageni nelle condizioni sperimentali del presente saggio, sia in presenza che assenza di attivazione metabolica.

Criteri di validità del test:

Il test è considerato valido se:

- la coltura post-incubazione iniziale fa registrare un OD600 maggiore o uguale a 2;
- il controllo di sterilità mostra valori di OD600 inferiori a 0.05
- il batch di S9 usato nello studio mostra l'appropriata attività biologica.
- il controllo positivo effettuato con la sostanza di riferimento mostra l'incremento atteso, per i ceppi in esame il numero di pozzetti revertiti deve essere >25.


Nel presente caso i test sono considerati validi.

Conclusioni

In base ai test di genotossicità svolti sui campioni di acqua marina e sulle acque da lisciviazione del suolo, tutti i campioni risultano non mutageni nelle condizioni sperimentali del saggio, sia in presenza che assenza di attivazione metabolica.

Firma del tecnico


Stefano Ceriati


Data

Saggio di inibizione della crescita di alghe marine

Si trasmettono i risultati dei test di inibizione dell'emissione luminosa effettuato con *Phaeodactylum tricorutum* sui campioni di acqua marina così come ricevuti.

Identificativo dei campioni

Tabella 1: Identificazione campioni analizzati

Nome campione	Acqua marina A_1	Acqua marina A_2	Acqua marina A_3	Acqua marina A_4	Acqua marina A_5
Codice campione ChemService	2201406-001	2201406-002	2201406-003	2201406-004	2201406-005
Data di campionamento	17/05/2022	17/05/2022	17/05/2022	17/05/2022	17/05/2022
Data di ricevimento in laboratorio	19/05/2022	19/05/2022	19/05/2022	19/05/2022	19/05/2022
Quantità	~2000 mL	~2000 mL	~2000 mL	~2000 mL	~2000 mL
Contenitore	Bottiglia in HDPE	Bottiglia in HDPE	Bottiglia in HDPE	Bottiglia in HDPE	Bottiglia in HDPE

Metodiche impiegate per i saggi

I campioni di acqua marina sono stati congelati a -20°C all'arrivo in laboratorio. Per lo scongelamento si è utilizzata la procedura descritta nella linea guida UNI EN ISO 5667-16.

Il test di inibizione della crescita algale utilizzato per la valutazione degli effetti acuti e cronici dei campioni di acque marine è stato condotto seguendo il metodo "Water quality – Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema sp.* and *Phaeodactylum tricorutum*" descritto dalla norma europea UNI EN ISO 10253:2016, utilizzando l'alga diatomea unicellulare *Phaeodactylum tricorutum* acquistata originariamente da Ecotox LDS.

Condizioni del test:

Durata dell'esposizione: 72 ore
Intensità luminosa: tra 6000 e 10000 Lux (illuminazione continua)
Temperature: 20 ± 2 °C
(conforme al range raccomandato dalla UNI EN ISO 10253:2016)

Risultati

I saggi di Inibizione della crescita algale sono stati condotti su soluzioni al 98,5% di campione tal quale (TQ) a causa della necessità di ricostituire i campioni con la stessa miscela di sali del controllo negativo come descritto nella UNI EN ISO 10253:2017.

Tabella 2: valori di pH all'inizio e alla fine del test

campioni	Valori pH Inizio test – fine test
Controllo negativo	7.96 – 8.59
2201406-001	7.43 – 8.90
2201406-002	7.11 – 8.95
2201406-003	7.02 – 9.02
2201406-004	7.28 – 8.98
2201406-005	7.17 – 8.85

(conforme al massimo incremento per il controllo negativo di 1.0 punti durante il saggio UNI EN ISO 10253:2017)

Criteri di validità del controllo:

Il test è considerato valido perchè nel controllo:

- il fattore di crescita della biomassa è risultato 54 (accettabile se ≥ 16);
- la variazione media del tasso di crescita tra le repliche: è risultato 0,9 % (accettabile se ≤ 7)

Tabella 3: Risultati biologici: Yield e tasso di crescita dopo 72 ore di esposizione

Campioni	Risultati dopo 72 ore			
	Yield	% inibizione della Yield	Tasso di crescita	% inibizione del tasso di crescita
Controllo negativo	540875,8	-	1,33	-
2201406-001	1072086,3	0,0	1,56	0,0
2201406-002	888398,2	0,0	1,49	0,0
2201406-003	801555,4	0,0	1,46	0,0
2201406-004	866422,2	0,0	1,49	0,0
2201406-005	793219,8	0,0	1,46	0,0

In base ai risultati ottenuti, si stabiliscono NOEC, LOEC ed EC₅₀.

Tabella 4: risultati degli endpoint: Biomassa e Tasso di crescita

Valore ricercato	Diluizione del campione – Percentuale di campione
NOEC	98,5%
LOEC	>98,5%
EyC ₅₀	>98,5%
ErC ₅₀	>98,5%

NOEC = concentrazione di non effetto

LOEC = la più bassa concentrazione ad avere un effetto sugli organismi

EyC₅₀ = concentrazione alla quale si ha l'inibizione del 50% della biomassa algale


ErC₅₀ = concentrazione alla quale si ha l'inibizione del 50% del tasso di crescita algale

Conclusioni

In base ai test ecotossicologici effettuati sui campioni di acqua marina non si è evidenziato un effetto tossico statisticamente significativo su *P. tricornutum* per tutti i campioni indagati.

Firma del tecnico


Stefano Ceriati


Data

Saggio di inibizione dell'emissione luminosa su *Vibrio fischeri*

Si trasmettono i risultati dei test di inibizione dell'emissione luminosa effettuato con *Vibrio fischeri* sui campioni di acqua marina così come ricevuti.

Identificativo dei campioni

Tabella 1: Identificazione campioni analizzati

Nome campione	Acqua marina A_1	Acqua marina A_2	Acqua marina A_3	Acqua marina A_4	Acqua marina A_5
Codice campione ChemService	2201406-001	2201406-002	2201406-003	2201406-004	2201406-005
Data di campionamento	17/05/2022	17/05/2022	17/05/2022	17/05/2022	17/05/2022
Data di ricevimento in laboratorio	19/05/2022	19/05/2022	19/05/2022	19/05/2022	19/05/2022
Quantità	~2000 mL	~2000 mL	~2000 mL	~2000 mL	~2000 mL
Contenitore	Bottiglia in HDPE	Bottiglia in HDPE	Bottiglia in HDPE	Bottiglia in HDPE	Bottiglia in HDPE

Metodiche impiegate per i saggi

I campioni di acqua marina sono stati congelati a -20°C all'arrivo in laboratorio. Per lo scongelamento si è utilizzata la procedura descritta nella linea guida UNI EN ISO 5667-16.

Il test di tossicità acuta su *Vibrio fischeri* è stato condotto seguendo il metodo descritto nella linea guida UNI EN ISO 11348-3.

Il saggio si basa sulla capacità di questo batterio di essere bioluminescente in condizioni ottimali. Una diminuzione della luce emessa è quindi attribuibile ad effetti tossici del campione testato.

Risultati

Tabella 2: parametri dei campioni TQ all'inizio del test

Codice campione	Valori salinità (‰)	Valori ossigeno disciolto (mg/L)	Valori pH
Controllo negativo	31	7,38	7,62
2201406-001	38	6,51	7,48
2201406-002	37	6,54	7,15
2201406-003	36	6,82	7,31
2201406-004	37	6,19	7,43
2201406-005	36	6,67	7,57

(pH conforme al range raccomandato dalla UNI EN ISO 11348-3 compreso tra 6,0 e 8,5)

I saggi sono stati effettuati sul campione tal quale e su 4 diluizioni con un fattore di diluizione D=2.

Di seguito vengono riportati i risultati ottenuti dalle letture di emissione luminosa ottenute.

Campione 2201406-001

Tabella 3: letture dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione

Conc (%)	Letture a 5 minuti		Letture a 15 minuti		Letture a 30 minuti	
	Gamma	% Effect	Gamma	% Effect	Gamma	% Effect
0	1,219#		1,287#		1,332#	
5,63	-0,0685	-7,35%	-0,0570	-6,05%	-0,0603	-6,42%
11,25	-0,0272	-2,80%	-0,0416	-4,34%	-0,0408	-4,26%
22,5	-0,0580	-6,16%	-0,0570	-6,05%	-0,0629	-6,72%
45	-0,0326	-3,37%	-0,0405	-4,22%	-0,0331	-3,42%
90	-0,0443	-4,64%	-0,0432	-4,51%	-0,0380	-3,95%

Campione 2201406-002
Tabella 4 letture dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione

Conc (%)	Letture a 5 minuti		Letture a 15 minuti		Letture a 30 minuti	
	Gamma	% Effect	Gamma	% Effect	Gamma	% Effect
0	1,175#		1,295#		1,362#	
5,63	-0,0412	-4,30%	-0,0328	-3,40%	-0,0397	-4,13%
11,25	-0,0278	-2,86%	-0,0261	-2,68%	-0,0322	-3,33%
22,5	-0,0359	-3,73%	-0,0323	-3,34%	-0,0480	-5,05%
45	-0,0136	-1,38%	-0,0061	-0,62%	-0,0123	-1,25%
90	-0,0193	-1,97%	0,0083	0,82%	-0,0146	-1,48%

Campione 2201406-003
Tabella 5 letture dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione

Conc (%)	Letture a 5 minuti		Letture a 15 minuti		Letture a 30 minuti	
	Gamma	% Effect	Gamma	% Effect	Gamma	% Effect
0	1,311#		1,476#		1,591#	
5,63	-0,0254	-2,60%	-0,0164	-1,67%	-0,0314	-3,24%
11,25	-0,0244	-2,50%	-0,0325	-3,35%	-0,0248	-2,55%
22,5	-0,0214	-2,19%	-0,0241	-2,47%	-0,0189	-1,93%
45	-0,0278	-2,86%	-0,0207	-2,11%	-0,0325	-3,36%
90	0,0138	1,36%	0,0005	0,05%	-0,0304	-3,13%

Campione 2201406-004
Tabella 6 letture dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione

Conc (%)	Letture a 5 minuti		Letture a 15 minuti		Letture a 30 minuti	
	Gamma	% Effect	Gamma	% Effect	Gamma	% Effect
0	1,271#		1,472#		1,599#	
5,63	-0,0452	-4,74%	-0,0287	-2,96%	-0,0381	-3,96%
11,25	-0,0301	-3,10%	-0,0285	-2,93%	-0,0249	-2,56%
22,5	-0,0763	-8,26%	-0,0586	-6,23%	-0,0592	-6,29%
45	-0,0539	-5,70%	-0,0447	-4,68%	-0,0349	-3,62%
90	0,0482	4,60%	0,0455	4,36%	0,0290	2,82%

Campione 2201406-005

Tabella 7 letture dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione

Conc (%)	Letture a 5 minuti		Letture a 15 minuti		Letture a 30 minuti	
	Gamma	% Effect	Gamma	% Effect	Gamma	% Effect
0	1,290#		1,476#		1,653#	
5,63	-0,0233	-2,38%	-0,0377	-3,92%	-0,0215	-2,20%
11,25	0,0127	1,25%	-0,0082	-0,83%	0,0096	0,96%
22,5	0,0006	0,06%	-0,0122	-1,24%	0,0061	0,60%
45	-0,0244	-2,50%	-0,0247	-2,53%	-0,0044	-0,44%
90	-0,0374	-3,88%	-0,0326	-3,37%	-0,0161	-1,63%

Criterio di validità del test:

Il test è considerato valido perchè:

- I valori di gamma (#) per le letture a 15 o 30 minuti di incubazione sono risultate comprese tra 0,6 e 1,8.

In base ai risultati ottenuti nelle tabelle precedenti, gli EC₂₀ e EC₅₀ sono stati calcolati come segue:

Tabella 8 risultati dell'endpoint: Inibizione della bioluminescenza

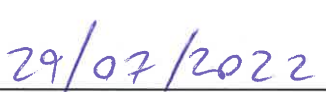
Valore ricercato	2201416-001	2201416-002	2201416-003	2201416-004	2201416-004
EC ₂₀	>TQ (>90%)	>TQ (>90%)	>TQ (>90%)	>TQ (>90%)	>TQ (>90%)
EC ₅₀	>TQ (>90%)	>TQ (>90%)	>TQ (>90%)	>TQ (>90%)	>TQ (>90%)

Conclusioni

In base ai test ecotossicologici effettuati sui campioni di acqua marina non si è evidenziato un effetto tossico su *V. fischeri*, per tutti i campioni indagati.

Firma del tecnico


Stefano Ceriati


Data