



FARM srl
TESTING – RESEARCH - SOLUTION

Uffici e Laboratori:
00012 GUIDONIA MONTECELIO (RM)
Via Lago dei Tartari, 73

Tel.: 0774_050331 r.a. - 0774_379083
Fax: 0774_378688
e-mail: info.roma@farmlab.it

www.farmlab.it



LAB N°0703 L

Spett.le
ASSOFOND
Federazione Nazionale delle Fonderie
Via Copernico, 54
20090 TREZZANO SUL NAVIGLIO
(MI)

RAPPORTO DI PROVA N°: 191537-01AVX

PRODUTTORE:
PRELEVATO DA:
ORA PRELIEVO: --

LUOGO DI PRELIEVO:
IN DATA: 18/07/2019
ALLA PRESENZA DI: --

RICEVUTO IN DATA: 16/09/2019
NUMERO VERBALE DI CAMPIONAMENTO: --

INIZIO PROVA: 16/10/2019
FINE PROVA: 18/10/2019

CAMPIONE: 1537-01 _ Rifiuto terre di Fonderia, Codice EER 10 09 08
Test Ecotossicologici

PARAMETRO	VALORE	Unità di Misura	LOQ	METODO
Test di tossicità acuta con Zebrafish (concentrazione limite)*	>100	mg/L	-	OECD/OECD 203 (2019)
Saggio ecotossicologico – Daphnia magna Straus (concentrazione limite)*	>100	mg/L	-	OECD/OECD 202 (2004)
Test di ecotossicità con pseudokirchnerilla subcapitata (concentrazione limite)*	>100	mg/L	-	OECD/OECD 201 (2011)
Test cronico di tossicità con Daphnia magna Straus*	>1	mg/L	-	OECD/OECD 211 (2012)

NOTE

Le prove contrassegnate con * sono state effettuate presso il laboratorio convenzionato con la Farm srl

Resp. di Commessa _____ AV _____

Roma, 28/10/2019

Il Responsabile di Laboratorio

dr. F. Farinelli



Mod. 013-g7 Rev. 10 270819

Analisi eseguite presso: **farm** s.r.l.

Società Certificata
UNI EN ISO 9001:2015
Limitatamente allo scopo sdr
SGQ Certificato n° 246

Rapporto di Prova n°: 191537-01AVX

Il presente Rapporto di Prova riguarda solo i campioni sottoposti a prova e NON può essere riprodotto parzialmente salvo approvazione scritta da parte della Società FARM srl



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

Campione in prova:
TERRE FONDERIA 1537
(ID campione: 201910832)

Relazione Tecnica n.:
RT 190664 rev. 00
del 01/10/2019

Committente:
FARM s.r.l.
Via Lago dei Tartari, 73
00012 Guidonia Montecelio (RM)

STATO DELLE REVISIONI DEL DOCUMENTO

REV.	DATA	OGGETTO DELLA REVISIONE
00	01/10/2019	EMISSIONE DOCUMENTO

PROCEDIMENTO DI APPROVAZIONE

ESECUTORE DELLE PROVE		REDATTO		APPROVATO	
FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA
TECNICO DI LABORATORIO MICROBIOLOGICO	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 Principio del metodo	3
4.2 Riferimenti	3
4.3 Apparecchiatura utilizzata	4
4.4 Reagenti.....	4
4.5 Preparazione del campione.....	5
4.6 Metodo di prova	5
5. Dati grezzi	6
6. Calcoli.....	8
6.1 Criteri di validità	8
7. Risultati e conclusioni	8
8. Archivi.....	8
9. Bibliografia.....	8

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 compresa tra 1 e 2 cm, sono stati esposti al campione di prova, alla concentrazione limite di 100 mg/L, per un periodo di 96 ore.

La mortalità è stata 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

Il committente ha provveduto a spedire un campione di rifiuto, denominato TERRE FONDERIA 1537, al laboratorio di prova Lab-Control s.r.l., dove è stato identificato con l'ID 201910832.

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 Principio del metodo

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.

4.2 Riferimenti

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.

Il 5 luglio 2018 è entrato in vigore il "Regolamento (UE) 2017/997 del Consiglio, dell'8 giugno 2017, che modifica l'allegato III della direttiva 2008/98/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda la caratteristica di pericolo HP14".

Tale regolamento stabilisce i criteri di attribuzione della caratteristica HP14 "ecotossico" ai rifiuti e alle miscele di rifiuti; nello specifico dispone che, nel caso in cui si utilizzino dei test ecotossicologici, essi prevalgano sulle determinazioni analitiche di sostanze ecotossiche. Prevede inoltre che tali test debbano essere svolti ai sensi del regolamento CE n. 440/2008. La loro valutazione deve essere effettuata secondo quanto previsto dal "Regolamento (CE) N. 1272/2008 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele".

Quest'ultimo riporta al punto 4.1.2.6. i criteri per la classificazione e la categorizzazione delle sostanze come «pericolose per l'ambiente acquatico», sintetizzati nella tabella 4.1.0. del regolamento stesso. Tali criteri prevedono che una sostanza presenti pericolo acuto (a breve termine) per l'ambiente acquatico se la CL₅₀ (concentrazione letale per il 50% degli esemplari) a 96 ore per i pesci è ≤ 1 mg/L.

4.3 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.

4.4 Reagenti

ORGANISMO TEST

Il *Brachydanio rerio* (Zebrafish) è la specie sperimentale utilizzata. Il fornitore è EZRC European Zebrafish Resource Center Institute of toxicology and Genetics. 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. Essi 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 (fonte dati: Acquevenete 2019):

- concentrazione O₂ = 9,2 mg/L (deve essere > 5,14 mg/L a 23°C e 1 atm)
- salinità = 0,1‰ (calcolata dalla conducibilità; deve essere < 0,2‰)
- pH = 7,3 (deve essere 6,0-8,5)
- durezza = 120 mg CaCO₃/L (deve essere 40-250 mg CaCO₃/L, preferibilmente < 180 mg CaCO₃/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 allevamento.

4.6 Metodo di prova

Condizioni di esposizione

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 del metodo di prova OECD/OCDE 203:2019, al fine di ridurre il numero di esemplari utilizzati, può essere eseguito un test 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 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: 23/09/2019

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

Campione pesato: 90 g

Volume acqua di allevamento: 1000 ml

Inizio agitazione: 09:50

rpm: 10

2° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 24/09/2019

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. 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	8,21	8,84
100 mg/L	7,90	9,30

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

3° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 25/09/2019

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	8,03	8,43
100 mg/L	7,79	8,90

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

4° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 26/09/2019

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	7,84	8,03
100 mg/L	7,69	8,51

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

5° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 27/09/2019

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	7,66	7,62
100 mg/L	7,58	8,11

6° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 28/09/2019

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	7,47	7,21
100 mg/L	7,47	7,71

6. Calcoli

Alla concentrazione limite di 100 mg/L il campione non induce la mortalità di alcuno dei 7 esemplari (0/7). Nel test a concentrazione 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/ 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 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 e conclusioni

Il REGOLAMENTO (CE) N. 1272/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all' etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele riporta al punto 4.1.2.6. i criteri per la classificazione e la categorizzazione delle sostanze come «pericolose per l'ambiente acquatico» sintetizzati nella Tabella 4.1.0. (vedi di seguito), dove viene indicato che una sostanza presenta pericolo acuto (a breve termine) per l'ambiente acquatico se la CL₅₀ a 96 ore per i pesci è ≤ 1 mg/L.

Alla concentrazione limite di 100 mg/L, il campione testato non induce alcuna mortalità degli Zebrafish a riprova della mancanza di effetto tossico. La CL₅₀ risulta, quindi, maggiore di tale concentrazione limite. Pertanto, il campione può essere classificato come non pericoloso a breve termine per l'ambiente acquatico (tossicità acuta per i pesci).

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.

Tab. 4.1.0 *Categorie di classificazione delle sostanze pericolose per l'ambiente acquatico - REGOLAMENTO (CE) N. 1272/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006 (testo consolidato 2018), noto come regolamento CLP*

a) Pericolo a breve termine (acuto) per l'ambiente acquatico		
<u>Categoria Acuto 1:</u>	(Nota 1)	
CL ₅₀ a 96 ore (per i pesci)	≤ 1 mg/l e/o	
CE ₅₀ a 48 ore (per i crostacei)	≤ 1 mg/l e/o	
CrE ₅₀ a 72 o 96 ore (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 1 mg/l.	(Nota 2)
b) Pericolo a lungo termine (cronico) per l'ambiente acquatico		
i) Sostanze non rapidamente degradabili (Nota 3) per le quali sono disponibili dati adeguati sulla tossicità cronica		
<u>Categoria Cronico 1:</u>	(Nota 1)	
NOEC o EC _x cronica (per i pesci)	≤ 0,1 mg/l e/o	
NOEC o EC _x cronica (per i crostacei)	≤ 0,1 mg/l e/o	
NOEC o EC _x cronica (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 0,1 mg/l.	
<u>Categoria Cronico 2:</u>		
NOEC o EC _x cronica (per i pesci)	≤ 1 mg/l e/o	
NOEC o EC _x cronica (per i crostacei)	≤ 1 mg/l e/o	
NOEC o EC _x cronica (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 1 mg/l.	

(continua)

(continuazione)

ii) Sostanze rapidamente degradabili (Nota 3) per le quali sono disponibili dati adeguati sulla tossicità cronica

<u>Categoria Cronico 1:</u>	(Nota 1)
NOEC o EC _x cronica (per i pesci)	≤ 0,01 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per i crostacei)	≤ 0,01 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 0,01 mg/l.
<u>Categoria Cronico 2:</u>	
NOEC o EC _x cronica (per i pesci)	≤ 0,1 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per i crostacei)	≤ 0,1 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 0,1 mg/l.
<u>Categoria Cronico 3:</u>	
NOEC o EC _x cronica (per i pesci)	≤ 1 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per i crostacei)	≤ 1 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 1 mg/l.

(continua)

(continuazione)

iii) Sostanze per le quali non sono disponibili dati adeguati sulla tossicità cronica

Categoria Cronico 1: (Nota 1)

CL₅₀ a 96 ore (per i pesci) ≤ 1 mg/l e/o

CE₅₀ a 48 ore (per i crostacei) ≤ 1 mg/l e/o

CrE₅₀ a 72 o 96 ore (per le alghe o altre piante acquatiche) ≤ 1 mg/l. (Nota 2)

e la sostanza non è rapidamente degradabile e/o il BCF determinato in via sperimentale ≥ 500

(o, se non disponibile, il log K_{ow} ≥ 4). (Nota 3).

Categoria Cronico 2:

CL₅₀ a 96 ore (per i pesci) > 1 fino a ≤ 10 mg/l e/o

CE₅₀ a 48 ore (per i crostacei) > 1 fino a ≤ 10 mg/l e/o

CrE₅₀ a 72 o 96 ore (per le alghe o altre piante acquatiche) >1 fino a ≤ 10 mg/l. (Nota 2)

e la sostanza non è rapidamente degradabile e/o il BCF determinato in via sperimentale ≥ 500

(o, se non disponibile, il log K_{ow} ≥ 4). (Nota 3).

(continua)

(continuazione)

Categoria Cronico 3:

CL₅₀ a 96 ore (per i pesci) > 10 fino a ≤ 100 mg/l e/o

CE₅₀ a 48 ore (per i crostacei) > 10 fino a ≤ 100 mg/l e/o

CrE₅₀ a 72 o 96 ore (per le alghe o altre piante acquatiche) > 10 fino a ≤ 100 mg/l (Nota 2)

e la sostanza non è rapidamente degradabile e/o il BCF determinato in via sperimentale ≥ 500

(o, se non disponibile, il log K_{ow} ≥ 4). (Nota 3).

Classificazione «rete di sicurezza»

Categoria Cronico 4:

Casi nei quali i dati non consentono la classificazione in base ai criteri di cui sopra, ma sussistono comunque motivi di preoccupazione. In tali casi sono comprese, ad esempio, le sostanze scarsamente solubili per le quali non si registra tossicità acuta fino alle concentrazioni corrispondenti alla solubilità in acqua (Nota 4), che non sono rapidamente degradabili secondo il punto 4.1.2.9.5 e possiedono un fattore di bioconcentrazione determinato per via sperimentale BCF ≥ 500 (o, se non disponibile, un log K_{ow} ≥ 4), indicante un potenziale di bioaccumulo, che sono classificate in questa categoria, a meno che altri dati scientifici indichino che la classificazione non è necessaria. Tali dati comprendono le NOEC di tossicità cronica > solubilità nell'acqua o > 1 mg/l o altri dati di rapida degradazione nell'ambiente rispetto a quelli forniti dai metodi elencati al punto 4.1.2.9.5.

(continua)

(continuazione)

Nota 1

Quando si classificano sostanze nella categoria Acuto 1 e/o nella categoria Cronico 1 è necessario indicare anche un fattore moltiplicatore appropriato (cfr. tabella 4.1.3).

Nota 2

La classificazione si basa sulla CrE_{50} [= CE_{50} (tasso di crescita)]. Quando la base della CE_{50} non è specificata o non è registrata alcuna CrE_{50} , la classificazione si basa sul valore CE_{50} minimo disponibile.

Nota 3

Se non sono disponibili dati utili sulla degradabilità, siano essi determinati in via sperimentale o attraverso stime, la sostanza va considerata non rapidamente degradabile.

Nota 4

«Nessuna tossicità acuta» significa che la/le $C(E)L_{50}$ è/sono superiore/i alla solubilità in acqua. Questo vale anche per le sostanze scarsamente solubili (solubilità in acqua < 1 mg/l), per le quali esistono dati indicanti che il test di tossicità acuta non fornisce la misura reale della tossicità intrinseca.



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

Campione in prova:
TERRE FONDERIA 1537
(ID campione: 201910832)

Relazione Tecnica n.:
RT 190665 rev. 00
del 01/10/2019

Committente:
FARM s.r.l.
Via Lago dei Tartari, 73
00012 Guidonia Montecelio (RM)

STATO DELLE REVISIONI DEL DOCUMENTO

REV.	DATA	OGGETTO DELLA REVISIONE
00	01/10/2019	EMISSIONE DOCUMENTO

PROCEDIMENTO DI APPROVAZIONE

ESECUTORE DELLE PROVE		REDATTO		APPROVATO	
FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA
TECNICO DI LABORATORIO MICROBIOLOGICO	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 Principio del metodo	3
4.2 Sostanza di riferimento	3
4.3 Riferimenti	3
4.4 Apparecchiatura utilizzata	4
4.5 Reagenti e materiali.....	4
4.6 Preparazione del campione	4
4.7 Metodo di prova	5
5. Dati grezzi	6
6. Calcoli.....	7
6.1 Criteri di validità	7
7. Risultati e conclusioni	7
8. Archivi	8
9. Bibliografia.....	8

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, alle concentrazioni 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 verificare se la concentrazione limite di 100 mg/L del campione in prova ha un effetto negativo sul crostaceo d'acqua dolce *Daphnia magna* Straus, al fine di valutare se il campione possa presentare o meno effetti di tossicità acuta per l'ambiente acquatico.

3. Campione oggetto dello studio

Il committente ha provveduto a spedire un campione di rifiuto, denominato TERRE FONDERIA 1537, al laboratorio di prova Lab-Control s.r.l., dove è stato identificato con l'ID 201910832.

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 Principio del metodo

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

I risultati vengono elaborati ed analizzati per discriminare il valore di CE₅₀ del campione a 48h.

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.

4.3 Riferimenti

Il seguente studio fa riferimento al metodo "OECD/OCDE 202:2004 – OECD guideline for testing of chemicals – *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test".

Il 5 luglio 2018 è entrato in vigore il “Regolamento (UE) 2017/997 del Consiglio, dell’8 giugno 2017, che modifica l'allegato III della direttiva 2008/98/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda la caratteristica di pericolo HP14”.

Tale regolamento stabilisce i criteri di attribuzione della caratteristica HP14 ai rifiuti e alle miscele di rifiuti; nello specifico dispone che, nel caso in cui si utilizzino dei test ecotossicologici, essi prevalgano sulle determinazioni analitiche di sostanze ecotossiche. Prevede inoltre che tali test debbano essere svolti ai sensi del regolamento CE n. 440/2008. La loro valutazione deve essere effettuata secondo quanto previsto dal “Regolamento (CE) N. 1272/2008 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele”. Quest’ultimo riporta al punto 4.1.2.6. i criteri per la classificazione e la categorizzazione delle sostanze come «pericolose per l'ambiente acquatico», sintetizzati nella tabella 4.1.0. del regolamento stesso. Tali criteri prevedono che una sostanza presenti pericolo acuto (a breve termine) per l’ambiente acquatico se la CE_{50} (concentrazione che immobilizza il 50% degli esemplari) a 48 ore per i crostacei è ≤ 1 mg/L.

4.4 Apparecchiatura utilizzata

- Recipienti aventi un volume di 50 ml, ermeticamente chiusi, 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.

4.5 Reagenti e materiali

ORGANISMO TEST

Daphnia magna Straus è la specie sperimentale utilizzata (lotto DM131218, 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 $\mu\text{S/cm}$

4.6 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 Metodo di prova

Condizioni di esposizione

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 100,0 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: 23/09/2019

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

Inizio agitazione: 09:50

rpm: 10

2° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 24/09/2019

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 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	7,90	8,99
100 mg/L	7,90	8,97

L'esposizione degli organismi al campione è cominciata alle ore 10:30 alle condizioni descritte sopra.

3° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 25/09/2019

Dopo 24 ore di esposizione, alle ore 10:30, 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
Controllo	0/5	0/5	0/5	0/5
100 mg/L	0/5	0/5	0/5	0/5

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	8,24	9,03
100 mg/L	8,40	9,00

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

4° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 26/09/2019

Dopo altre 24 ore di esposizione, alle ore 10:30, 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
Controllo	0/5	0/5	0/5	0/5
100 mg/L	0/5	0/5	0/5	0/5

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	8,57	9,06
100 mg/L	8,89	9,02

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 organizzato da ARPA Emilia-Romagna, si è trovata una CE_{50} a 24 ore per il cloruro di potassio KCl (MR) pari a 973,5 mg/L; in base agli esiti del circuito, pubblicati a maggio 2019, l'intervallo di accettabilità dei risultati era 585-1010,2 mg/L e lo z-score risultava pari a 1,32 (deve essere $-2 < z < +2$)

7. Risultati e conclusioni

Il REGOLAMENTO (CE) N. 1272/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele riporta al punto 4.1.2.6. i criteri per la classificazione e la categorizzazione delle sostanze come «pericolose per l'ambiente acquatico» sintetizzati nella Tabella 4.1.0. (vedi di seguito) dove viene indicato che una sostanza presenta pericolo acuto (a breve termine) per l'ambiente acquatico se la CE_{50} a 48 ore per i crostacei è ≤ 1 mg/L.

Alla concentrazione limite di 100 mg/L, il campione testato non induce effetti negativi sui crostacei e il valore di CE_{50} risulta, quindi, maggiore di 100 mg/L. Pertanto, il campione non presenta pericolo a breve termine in ambiente acquatico (tossicità acuta per i crostacei).

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.

Tab. 4.1.0 *Categorie di classificazione delle sostanze pericolose per l'ambiente acquatico - REGOLAMENTO (CE) N. 1272/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006 (testo consolidato 2018), noto come regolamento CLP*

a) Pericolo a breve termine (acuto) per l'ambiente acquatico		
<u>Categoria Acuto 1:</u>	(Nota 1)	
CL ₅₀ a 96 ore (per i pesci)	≤ 1 mg/l e/o	
CE ₅₀ a 48 ore (per i crostacei)	≤ 1 mg/l e/o	
CrE ₅₀ a 72 o 96 ore (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 1 mg/l.	(Nota 2)
b) Pericolo a lungo termine (cronico) per l'ambiente acquatico		
i) Sostanze non rapidamente degradabili (Nota 3) per le quali sono disponibili dati adeguati sulla tossicità cronica		
<u>Categoria Cronico 1:</u>	(Nota 1)	
NOEC o EC _x cronica (per i pesci)	≤ 0,1 mg/l e/o	
NOEC o EC _x cronica (per i crostacei)	≤ 0,1 mg/l e/o	
NOEC o EC _x cronica (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 0,1 mg/l.	
<u>Categoria Cronico 2:</u>		
NOEC o EC _x cronica (per i pesci)	≤ 1 mg/l e/o	
NOEC o EC _x cronica (per i crostacei)	≤ 1 mg/l e/o	
NOEC o EC _x cronica (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 1 mg/l.	

(continua)

(continuazione)

ii) Sostanze rapidamente degradabili (Nota 3) per le quali sono disponibili dati adeguati sulla tossicità cronica

<u>Categoria Cronico 1:</u>	(Nota 1)
NOEC o EC _x cronica (per i pesci)	≤ 0,01 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per i crostacei)	≤ 0,01 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 0,01 mg/l.
<u>Categoria Cronico 2:</u>	
NOEC o EC _x cronica (per i pesci)	≤ 0,1 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per i crostacei)	≤ 0,1 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 0,1 mg/l.
<u>Categoria Cronico 3:</u>	
NOEC o EC _x cronica (per i pesci)	≤ 1 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per i crostacei)	≤ 1 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 1 mg/l.

(continua)

(continuazione)

iii) Sostanze per le quali non sono disponibili dati adeguati sulla tossicità cronica

Categoria Cronico 1: (Nota 1)

CL₅₀ a 96 ore (per i pesci) ≤ 1 mg/l e/o

CE₅₀ a 48 ore (per i crostacei) ≤ 1 mg/l e/o

CrE₅₀ a 72 o 96 ore (per le alghe o altre piante acquatiche) ≤ 1 mg/l. (Nota 2)

e la sostanza non è rapidamente degradabile e/o il BCF determinato in via sperimentale ≥ 500

(o, se non disponibile, il log K_{ow} ≥ 4). (Nota 3).

Categoria Cronico 2:

CL₅₀ a 96 ore (per i pesci) > 1 fino a ≤ 10 mg/l e/o

CE₅₀ a 48 ore (per i crostacei) > 1 fino a ≤ 10 mg/l e/o

CrE₅₀ a 72 o 96 ore (per le alghe o altre piante acquatiche) >1 fino a ≤ 10 mg/l. (Nota 2)

e la sostanza non è rapidamente degradabile e/o il BCF determinato in via sperimentale ≥ 500

(o, se non disponibile, il log K_{ow} ≥ 4). (Nota 3).

(continua)

(continuazione)

Categoria Cronico 3:

CL₅₀ a 96 ore (per i pesci) > 10 fino a ≤ 100 mg/l e/o

CE₅₀ a 48 ore (per i crostacei) > 10 fino a ≤ 100 mg/l e/o

CrE₅₀ a 72 o 96 ore (per le alghe o altre piante acquatiche) > 10 fino a ≤ 100 mg/l (Nota 2)

e la sostanza non è rapidamente degradabile e/o il BCF determinato in via sperimentale ≥ 500

(o, se non disponibile, il log K_{ow} ≥ 4). (Nota 3).

Classificazione «rete di sicurezza»

Categoria Cronico 4:

Casi nei quali i dati non consentono la classificazione in base ai criteri di cui sopra, ma sussistono comunque motivi di preoccupazione. In tali casi sono comprese, ad esempio, le sostanze scarsamente solubili per le quali non si registra tossicità acuta fino alle concentrazioni corrispondenti alla solubilità in acqua (Nota 4), che non sono rapidamente degradabili secondo il punto 4.1.2.9.5 e possiedono un fattore di bioconcentrazione determinato per via sperimentale BCF ≥ 500 (o, se non disponibile, un log K_{ow} ≥ 4), indicante un potenziale di bioaccumulo, che sono classificate in questa categoria, a meno che altri dati scientifici indichino che la classificazione non è necessaria. Tali dati comprendono le NOEC di tossicità cronica > solubilità nell'acqua o > 1 mg/l o altri dati di rapida degradazione nell'ambiente rispetto a quelli forniti dai metodi elencati al punto 4.1.2.9.5.

(continua)

(continuazione)

Nota 1

Quando si classificano sostanze nella categoria Acuto 1 e/o nella categoria Cronico 1 è necessario indicare anche un fattore moltiplicatore appropriato (cfr. tabella 4.1.3).

Nota 2

La classificazione si basa sulla CrE_{50} [= CE_{50} (tasso di crescita)]. Quando la base della CE_{50} non è specificata o non è registrata alcuna CrE_{50} , la classificazione si basa sul valore CE_{50} minimo disponibile.

Nota 3

Se non sono disponibili dati utili sulla degradabilità, siano essi determinati in via sperimentale o attraverso stime, la sostanza va considerata non rapidamente degradabile.

Nota 4

«Nessuna tossicità acuta» significa che la/le $C(E)L_{50}$ è/sono superiore/i alla solubilità in acqua. Questo vale anche per le sostanze scarsamente solubili (solubilità in acqua < 1 mg/l), per le quali esistono dati indicanti che il test di tossicità acuta non fornisce la misura reale della tossicità intrinseca.



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

Campione in prova:
TERRE FONDERIA 1537
(ID campione: 201910832)

Relazione Tecnica n.:
RT 190666 rev. 00
del 01/10/2019

Committente:
FARM s.r.l.
Via Lago dei Tartari, 73
00012 Guidonia Montecelio (RM)

STATO DELLE REVISIONI DEL DOCUMENTO

REV.	DATA	OGGETTO DELLA REVISIONE
00	01/10/2019	EMISSIONE DOCUMENTO

PROCEDIMENTO DI APPROVAZIONE

ESECUTORE DELLE PROVE		REDATTO		APPROVATO	
FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA
TECNICO DI LABORATORIO MICROBIOLOGICO	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 Principio del metodo	3
4.2 Sostanza di riferimento	3
4.3 Riferimenti.....	3
4.4 Apparecchiatura utilizzata	4
4.5 Reagenti.....	4
4.6 Preparazione del campione	5
4.7 Metodo di prova	5
5. Dati grezzi	7
6. Calcoli.....	8
6.1 Analisi statistica	10
6.2 Criteri di validità	11
7. Risultati e conclusioni	15
8. Archivi.....	15
9. Bibliografia.....	16

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 10 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 inibizione del 50% del tasso di crescita rispetto al controllo) del campione in prova sia maggiore della concentrazione limite testata 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.

3. Campione oggetto dello studio

Il committente ha provveduto a spedire un campione di rifiuto, denominato TERRE FONDERIA 1537, al laboratorio di prova Lab-Control s.r.l., dove è stato identificato con l'ID 201910832.

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 Principio del metodo

Le alghe, in crescita esponenziale alla partenza della prova, vengono esposte al campione per un periodo di 72 ore. La concentrazione algale viene registrata a 24, 48 e 72 ore e confrontata con i valori ottenuti dal controllo. I risultati vengono elaborati e analizzati per discriminare il valore di CrE₅₀ del campione a 72h.

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 Riferimenti

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".

Il 5 luglio 2018 è entrato in vigore il "Regolamento (UE) 2017/997 del Consiglio, dell'8 giugno 2017, che modifica l'allegato III della direttiva 2008/98/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda la caratteristica di pericolo HP14".

Tale regolamento stabilisce i criteri di attribuzione della caratteristica HP14 ai rifiuti e alle miscele di rifiuti; nello specifico dispone che, nel caso in cui si utilizzino dei test ecotossicologici, essi prevalgano sulle

determinazioni analitiche di sostanze ecotossiche. Prevede inoltre che tali test debbano essere svolti ai sensi del regolamento CE n. 440/2008. La loro valutazione deve essere effettuata secondo quanto previsto dal “Regolamento (CE) N. 1272/2008 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele”. Quest'ultimo riporta al punto 4.1.2.6. i criteri per la classificazione e la categorizzazione delle sostanze come «pericolose per l'ambiente acquatico», sintetizzati nella tabella 4.1.0. del regolamento stesso. Tali criteri prevedono che una sostanza presenti pericolo acuto (a breve termine) per l'ambiente acquatico se la Cr_{E50} a 72/96 ore per le alghe è ≤ 1 mg/L.

4.4 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

4.5 Reagenti

ORGANISMO TEST

L'alga *Pseudokirchneriella subcapitata* è la specie sperimentale utilizzata (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
Stock solution 1: macro nutrienti	
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
Stock solution 2: ferro	
FeCl ₃ •6H ₂ O	64 mg/L
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	100mg/L
Stock solution 3: elementi in tracce	
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
Stock solution 4: bicarbonato	
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 $8,1\pm 0,2$ usando acido idroclorico 1 mol/L o idrossido di sodio 1 mol/L.

4.6 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.

4.7 Metodo di 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. 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, come concordato col committente.

Condizioni di incubazione

La temperatura di incubazione è di 23 ± 2 °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 CO₂ 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 CO₂ 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: 23/09/2019

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

Inizio agitazione: 09:50
 rpm: 10

2° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 24/09/2019

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 (SC010219) per ricavare la concentrazione algale espressa in cellule/mL viene indicata dal fornitore ed è la seguente:

$$y = 1239642x - 23190$$

Quindi la concentrazione algale di partenza è risultata essere $2,639568 \times 10^4$ cellule/mL. L'incubazione è partita alle 14:30.

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	7,78	8,83
100 mg/L	7,89	8,87

3° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 25/09/2019

Dopo 24 ore di esposizione, alle ore 14:30, 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	0.061	0.060	0.067	0.060	0.068	0.072	0.065
100 mg/L	0.064	0.067	0.063	0.068	0.071	0.074	0.068

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

4° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 26/09/2019

Dopo altre 24 ore di esposizione, alle ore 14:30, 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	0.172	0.114	0.153	0.154	0.112	0.173	0.146
100 mg/L	0.161	0.155	0.171	0.165	0.158	0.168	0.163

5° GIORNO DELLO STUDIO – DATA: 27/09/2019

Dopo altre 24 ore di esposizione, alle ore 14:30, 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	0.751	0.609	0.521	0.746	0.600	0.574	0.634
100 mg/L	0.721	0.703	0.782	0.715	0.700	0.762	0.731

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	9,37	9,96
100 mg/L	9,48	9,62

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:

$$y = 1239642x - 23190$$

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	5.243E+04	5.119E+04	5.987E+04	5.119E+04	6.111E+04	6.606E+04	5.697E+04
100 mg/L	5.615E+04	5.987E+04	5.491E+04	6.111E+04	6.482E+04	6.854E+04	6.090E+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	1.900E+05	1.181E+05	1.665E+05	1.677E+05	1.156E+05	1.913E+05	1.582E+05
100 mg/L	1.764E+05	1.690E+05	1.888E+05	1.814E+05	1.727E+05	1.851E+05	1.789E+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	9.078E+05	7.318E+05	6.227E+05	9.016E+05	7.206E+05	6.884E+05	7.621E+05
100 mg/L	8.706E+05	8.483E+05	9.462E+05	8.632E+05	8.446E+05	9.214E+05	8.824E+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.

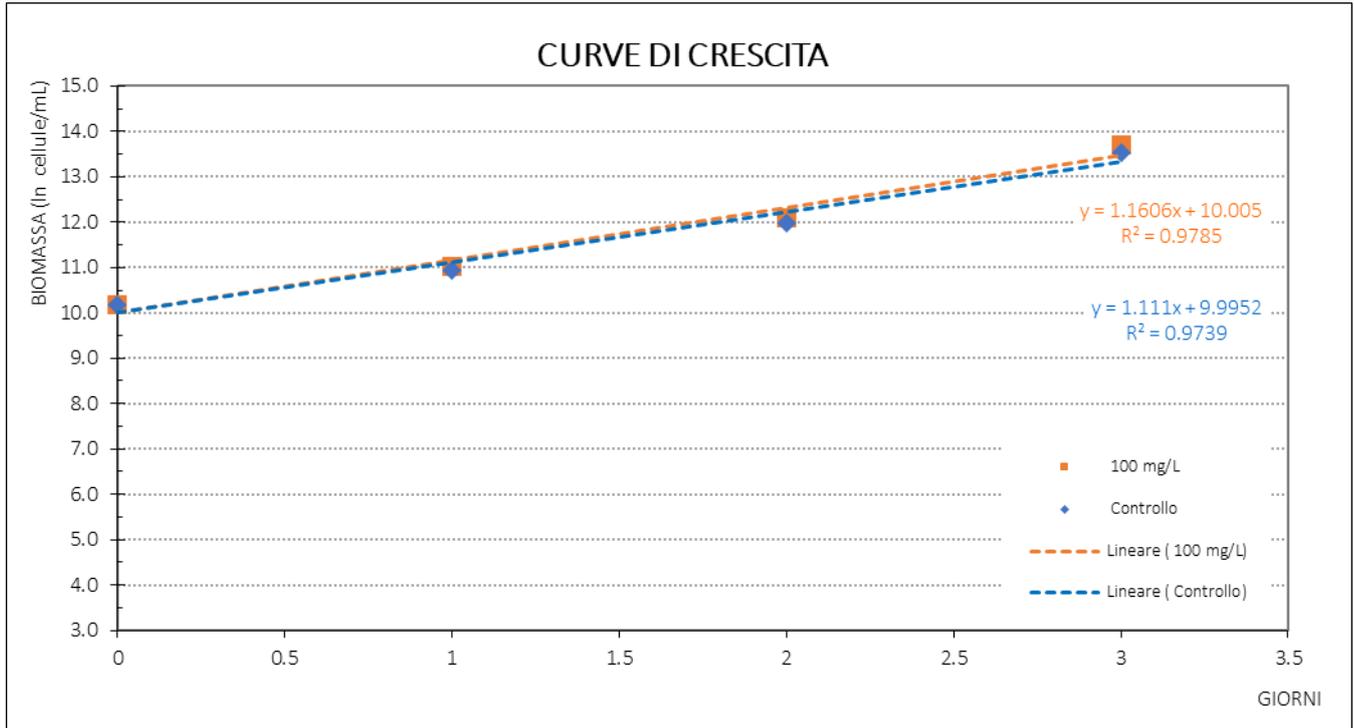


Fig. 1: curve di crescita algale a 72h della concentrazione limite e del controllo negativo. Biomassa in scala logaritmica (ln). La pendenza della retta rappresenta il tasso specifico di crescita (§44, OECD 201:2006).

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
μ_{i-j} 0-1	Controllo	0.69	0.66	0.82	0.66	0.84	0.92	0.76	0.109	14.2	-9.0
	100 mg/L	0.75	0.82	0.73	0.84	0.90	0.95	0.83	0.084	10.1	
μ_{i-j} 1-2	Controllo	1.29	0.84	1.02	1.19	0.64	1.06	1.01	0.237	23.5	-7.4
	100 mg/L	1.14	1.04	1.23	1.09	0.98	0.99	1.08	0.098	9.0	
μ_{i-j} 2-3	Controllo	1.56	1.82	1.32	1.68	1.83	1.28	1.58	0.241	15.2	-0.8
	100 mg/L	1.60	1.61	1.61	1.56	1.59	1.61	1.60	0.020	1.3	
μ_{i-j} medio	Controllo							1.12	0.075	6.7	

%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	1.179	1.107	1.054	1.177	1.102	1.087	1.118	---
100 mg/L	1.165	1.157	1.193	1.162	1.155	1.184	1.169	-4.63%

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	1.179	1.165																																							
Rep. 2	1.107	1.157																																							
Rep. 3	1.054	1.193																																							
Rep. 4	1.177	1.162																																							
Rep. 5	1.102	1.155																																							
Rep. 6	1.087	1.184																																							
Media	1.118	1.169																																							
%I _r = -4.63%																																									
			<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Controllo</th> <th>100 mg/L</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Media</td> <td>1.7103134</td> <td>1.7611538</td> </tr> <tr> <td>Varianza</td> <td>0.0004882</td> <td>0.0001727</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>2.8273226</td> <td></td> </tr> <tr> <td>P(F<=f) una coda</td> <td>0.1392999</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	1.7103134	1.7611538	Varianza	0.0004882	0.0001727	Osservazioni	6	6	gdl	5	5	F	2.8273226		P(F<=f) una coda	0.1392999		F critico una coda	5.0503291													
	Controllo	100 mg/L																																							
Media	1.7103134	1.7611538																																							
Varianza	0.0004882	0.0001727																																							
Osservazioni	6	6																																							
gdl	5	5																																							
F	2.8273226																																								
P(F<=f) una coda	0.1392999																																								
F critico una coda	5.0503291																																								
			Test t: due campioni assumendo uguale varianza																																						
			<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Controllo</th> <th>100 mg/L</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Media</td> <td>1.7103134</td> <td>1.7611538</td> </tr> <tr> <td>Varianza</td> <td>0.0004882</td> <td>0.0001727</td> </tr> <tr> <td>Osservazioni</td> <td>6</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>Varianza complessiva</td> <td>0.0003305</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Differenza ipotizzata per le medie</td> <td>0</td> <td></td> </tr> <tr> <td>gdl</td> <td>10</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Stat t</td> <td>-4.844118</td> <td></td> </tr> <tr> <td>P(T<=t) una coda</td> <td>0.0003387</td> <td></td> </tr> <tr> <td>t critico una coda</td> <td>1.8124611</td> <td></td> </tr> <tr> <td>P(T<=t) due code</td> <td>0.0006773</td> <td></td> </tr> <tr> <td>t critico due code</td> <td>2.2281389</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>				Controllo	100 mg/L	Media	1.7103134	1.7611538	Varianza	0.0004882	0.0001727	Osservazioni	6	6	Varianza complessiva	0.0003305		Differenza ipotizzata per le medie	0		gdl	10		Stat t	-4.844118		P(T<=t) una coda	0.0003387		t critico una coda	1.8124611		P(T<=t) due code	0.0006773		t critico due code	2.2281389	
	Controllo	100 mg/L																																							
Media	1.7103134	1.7611538																																							
Varianza	0.0004882	0.0001727																																							
Osservazioni	6	6																																							
Varianza complessiva	0.0003305																																								
Differenza ipotizzata per le medie	0																																								
gdl	10																																								
Stat t	-4.844118																																								
P(T<=t) una coda	0.0003387																																								
t critico una coda	1.8124611																																								
P(T<=t) due code	0.0006773																																								
t critico due code	2.2281389																																								

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 differenza significativa del tasso di crescita medio di *Pseudokirchneriella subcapitata* tra controllo e campione. Pertanto, il campione non ha influenza sulla crescita dell'alga e avremo CrE₅₀ > 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 28,87, 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)
(Agosto 2019)

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 (Alगतoxkit 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.

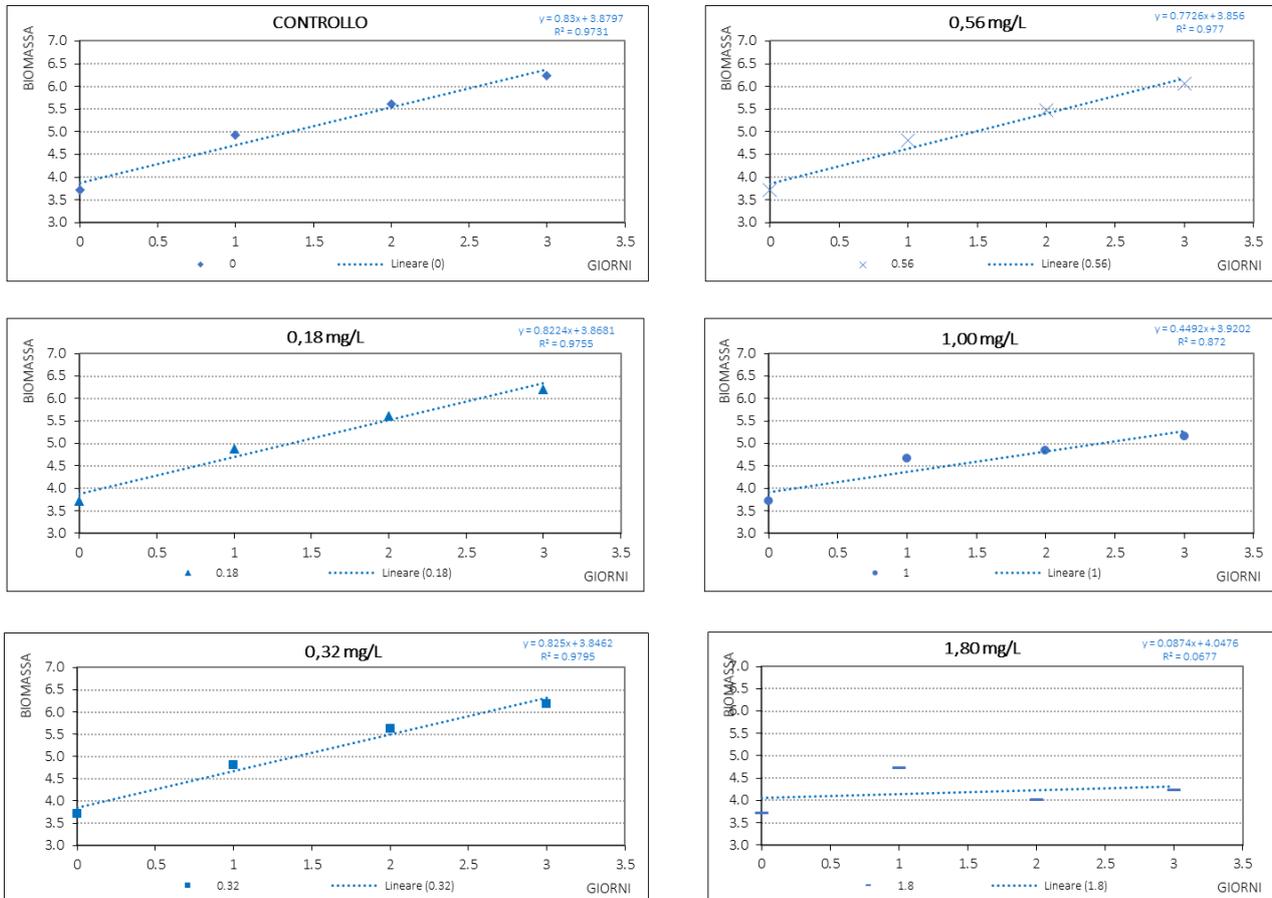


Fig. B1: curve di crescita algale alle varie concentrazioni testate del bicromato di potassio

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
$\mu_{i,j}$ 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.

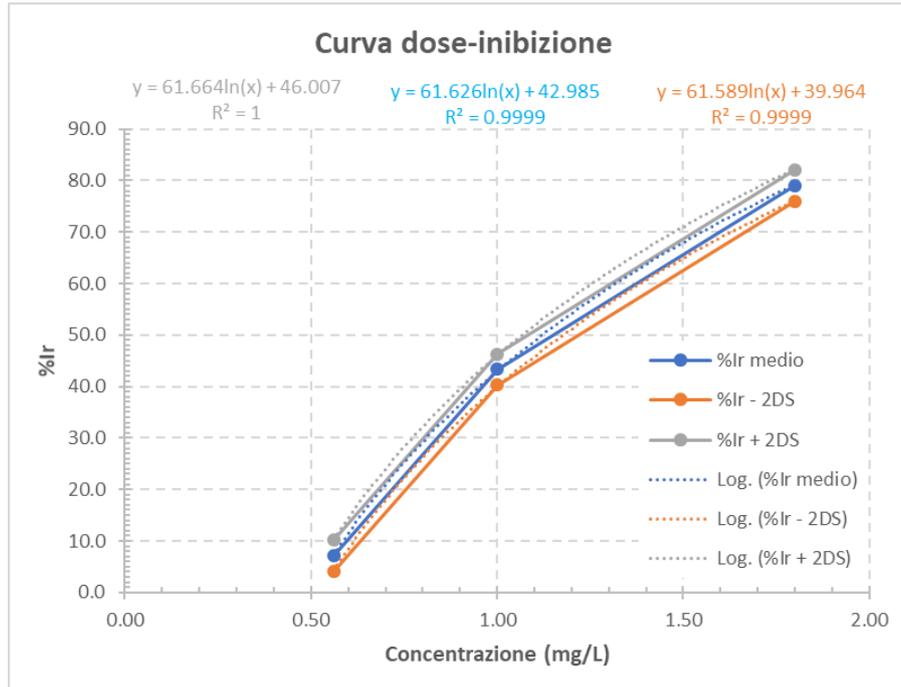


Fig. B2: curva dose-inibizione per il bicromato di potassio

7. Risultati e conclusioni

IL REGOLAMENTO (CE) N. 1272/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele riporta al punto 4.1.2.6. i criteri per la classificazione e la categorizzazione delle sostanze come «pericolose per l'ambiente acquatico» sintetizzati nella Tabella 4.1.0. (vedi di seguito), dove viene indicato che una sostanza presenta pericolo acuto (a breve termine) per l'ambiente acquatico se la CrE_{50} a 72/96 ore per le alghe è ≤ 1 mg/L.

Dopo 72h di crescita alla concentrazione limite di 100 mg/L, il campione testato non ha influenza sul tasso di crescita delle alghe rispetto al controllo. Pertanto, possiamo affermare che la CrE_{50} a 72h (concentrazione alla quale avremo $\%I_r \geq 50\%$) sarà maggiore di 100 mg/L e il campione non risulta tossico a breve termine per l'ambiente acquatico (tossicità acuta per le alghe).

Non avendo effetto la concentrazione limite testata, possiamo considerare anche che la NOEC (No Observed Effect Concentration) sia maggiore di 100 mg/L e, pertanto, il campione non risulta tossico neppure a lungo termine per l'ambiente acquatico, ovvero non rientra in alcuna delle Categorie 1-4 di tossicità cronica per le alghe di cui alla succitata Tab. 4.1.0.

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.

Tab. 4.1.0 *Categorie di classificazione delle sostanze pericolose per l'ambiente acquatico - REGOLAMENTO (CE) N. 1272/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006 (testo consolidato 2017), noto come regolamento CLP*

a) Pericolo a breve termine (acuto) per l'ambiente acquatico		
<u>Categoria Acuto 1:</u>	(Nota 1)	
CL ₅₀ a 96 ore (per i pesci)	≤ 1 mg/l e/o	
CE ₅₀ a 48 ore (per i crostacei)	≤ 1 mg/l e/o	
CrE ₅₀ a 72 o 96 ore (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 1 mg/l.	(Nota 2)
b) Pericolo a lungo termine (cronico) per l'ambiente acquatico		
i) Sostanze non rapidamente degradabili (Nota 3) per le quali sono disponibili dati adeguati sulla tossicità cronica		
<u>Categoria Cronico 1:</u>	(Nota 1)	
NOEC o EC _x cronica (per i pesci)	≤ 0,1 mg/l e/o	
NOEC o EC _x cronica (per i crostacei)	≤ 0,1 mg/l e/o	
NOEC o EC _x cronica (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 0,1 mg/l.	
<u>Categoria Cronico 2:</u>		
NOEC o EC _x cronica (per i pesci)	≤ 1 mg/l e/o	
NOEC o EC _x cronica (per i crostacei)	≤ 1 mg/l e/o	
NOEC o EC _x cronica (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 1 mg/l.	

(continua)

(continuazione)

ii) Sostanze rapidamente degradabili (Nota 3) per le quali sono disponibili dati adeguati sulla tossicità cronica

<u>Categoria Cronico 1:</u>	(Nota 1)
NOEC o EC _x cronica (per i pesci)	≤ 0,01 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per i crostacei)	≤ 0,01 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 0,01 mg/l.
<u>Categoria Cronico 2:</u>	
NOEC o EC _x cronica (per i pesci)	≤ 0,1 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per i crostacei)	≤ 0,1 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 0,1 mg/l.
<u>Categoria Cronico 3:</u>	
NOEC o EC _x cronica (per i pesci)	≤ 1 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per i crostacei)	≤ 1 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 1 mg/l.

(continua)

(continuazione)

iii) Sostanze per le quali non sono disponibili dati adeguati sulla tossicità cronica

Categoria Cronico 1: (Nota 1)

CL₅₀ a 96 ore (per i pesci) ≤ 1 mg/l e/o

CE₅₀ a 48 ore (per i crostacei) ≤ 1 mg/l e/o

CrE₅₀ a 72 o 96 ore (per le alghe o altre piante acquatiche) ≤ 1 mg/l. (Nota 2)

e la sostanza non è rapidamente degradabile e/o il BCF determinato in via sperimentale ≥ 500

(o, se non disponibile, il log K_{ow} ≥ 4). (Nota 3).

Categoria Cronico 2:

CL₅₀ a 96 ore (per i pesci) > 1 fino a ≤ 10 mg/l e/o

CE₅₀ a 48 ore (per i crostacei) > 1 fino a ≤ 10 mg/l e/o

CrE₅₀ a 72 o 96 ore (per le alghe o altre piante acquatiche) >1 fino a ≤ 10 mg/l. (Nota 2)

e la sostanza non è rapidamente degradabile e/o il BCF determinato in via sperimentale ≥ 500

(o, se non disponibile, il log K_{ow} ≥ 4). (Nota 3).

(continua)

(continuazione)

Categoria Cronico 3:

CL ₅₀ a 96 ore (per i pesci)	> 10 fino a ≤ 100 mg/l e/o
CE ₅₀ a 48 ore (per i crostacei)	> 10 fino a ≤ 100 mg/l e/o
CrE ₅₀ a 72 o 96 ore (per le alghe o altre piante acquatiche)	> 10 fino a ≤ 100 mg/l (Nota 2)

e la sostanza non è rapidamente degradabile e/o il BCF determinato in via sperimentale ≥ 500

(o, se non disponibile, il log K_{ow} ≥ 4). (Nota 3).

Classificazione «rete di sicurezza»

Categoria Cronico 4:

Casi nei quali i dati non consentono la classificazione in base ai criteri di cui sopra, ma sussistono comunque motivi di preoccupazione. In tali casi sono comprese, ad esempio, le sostanze scarsamente solubili per le quali non si registra tossicità acuta fino alle concentrazioni corrispondenti alla solubilità in acqua (Nota 4), che non sono rapidamente degradabili secondo il punto 4.1.2.9.5 e possiedono un fattore di bioconcentrazione determinato per via sperimentale BCF ≥ 500 (o, se non disponibile, un log K_{ow} ≥ 4), indicante un potenziale di bioaccumulo, che sono classificate in questa categoria, a meno che altri dati scientifici indichino che la classificazione non è necessaria. Tali dati comprendono le NOEC di tossicità cronica > solubilità nell'acqua o > 1 mg/l o altri dati di rapida degradazione nell'ambiente rispetto a quelli forniti dai metodi elencati al punto 4.1.2.9.5.

(continua)

(continuazione)

Nota 1

Quando si classificano sostanze nella categoria Acuto 1 e/o nella categoria Cronico 1 è necessario indicare anche un fattore moltiplicatore appropriato (cfr. tabella 4.1.3).

Nota 2

La classificazione si basa sulla CrE_{50} [= CE_{50} (tasso di crescita)]. Quando la base della CE_{50} non è specificata o non è registrata alcuna CrE_{50} , la classificazione si basa sul valore CE_{50} minimo disponibile.

Nota 3

Se non sono disponibili dati utili sulla degradabilità, siano essi determinati in via sperimentale o attraverso stime, la sostanza va considerata non rapidamente degradabile.

Nota 4

«Nessuna tossicità acuta» significa che la/le $C(E)L_{50}$ è/sono superiore/i alla solubilità in acqua. Questo vale anche per le sostanze scarsamente solubili (solubilità in acqua < 1 mg/l), per le quali esistono dati indicanti che il test di tossicità acuta non fornisce la misura reale della tossicità intrinseca.



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

Campione in prova:
TERRE FONDERIA 1537
(ID campione: 201910832)

Relazione Tecnica n.:
RT 190704 rev. 00
del 17/10/2019

Committente:
FARM s.r.l.
Via Lago dei Tartari, 73
00012 Guidonia Montecelio (RM)

STATO DELLE REVISIONI DEL DOCUMENTO

REV.	DATA	OGGETTO DELLA REVISIONE
00	17/10/2019	EMISSIONE DOCUMENTO

PROCEDIMENTO DI APPROVAZIONE

ESECUTORE DELLE PROVE		REDDATTO		APPROVATO	
FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA
TECNICO DI LABORATORIO MICROBIOLOGICO	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 Principio del metodo	3
4.2 Riferimenti	3
4.3 Apparecchiatura utilizzata	4
4.4 Reagenti	4
4.5 Preparazione.....	4
4.6 Metodo di prova	4
5. Dati grezzi	6
6. Risultati	7
6.1 Analisi statistica dei dati	7
6.1 Criteri di validità della prova	8
7. Conclusioni	8
8. Archivi	8
9. Bibliografia.....	8

1. Riassunto

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

2. Obiettivo dello studio

Lo scopo del presente studio preliminare in concentrazione limite è stato quello di determinare se il valore di CE_{50} (la concentrazione stimata che riduce nel 50% degli animali la capacità riproduttiva) e la NOEC (No Observed Effect Concentration) sul crostaceo d'acqua dolce *Daphnia magna* Straus del campione in prova sono superiori alla concentrazione limite (§ 36, OECD 211/2012) di 1 mg/L o, in caso contrario, se esso può presentare effetti di tossicità cronica per l'ambiente acquatico a concentrazioni inferiori.

3. Campione oggetto dello studio

Il committente ha provveduto a spedire un campione di rifiuto, denominato TERRE FONDERIA 1537, al laboratorio di prova Lab-Control s.r.l., dove è stato identificato con l'ID 201910832.

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 Principio del metodo

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 rifiuto in prova vengono poi confrontati statisticamente col bianco rappresentato dal solo medium di allevamento.

4.2 Riferimenti

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 (testo consolidato 2017) metodo C.20. Prova di riproduzione con *Daphnia magna*.

Il 5 luglio 2018 è entrato in vigore il "Regolamento (UE) 2017/997 del Consiglio, dell'8 giugno 2017, che modifica l'allegato III della direttiva 2008/98/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda la caratteristica di pericolo HP14".

Tale regolamento stabilisce i criteri di attribuzione della caratteristica HP14 ai rifiuti e alle miscele di rifiuti; nello specifico dispone che, nel caso in cui si utilizzino dei test ecotossicologici, essi prevalgano sulle determinazioni analitiche di sostanze ecotossiche. Prevede inoltre che tali test debbano essere svolti ai sensi del regolamento CE n. 440/2008. La loro valutazione deve essere effettuata secondo quanto previsto dal "Regolamento (CE) N. 1272/2008 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele". Quest'ultimo riporta al punto 4.1.2.6. i criteri per la classificazione e la categorizzazione delle sostanze come «pericolose per l'ambiente acquatico» (tossicità acuta e cronica), sintetizzati nella tabella 4.1.0. del regolamento stesso.

4.3 Apparecchiatura utilizzata

- Recipienti aventi un volume di 50 ml, ermeticamente chiusi, 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

ORGANISMO TEST

Daphnia magna Straus è la specie sperimentale utilizzata (lotto DM131218,, 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 COLTIVAZIONE 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 $\mu\text{S}/\text{cm}$

4.5 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 $0,45 \mu\text{m}$ prima di allestire la prova.

Il controllo negativo è composto dalla sola acqua di coltivazione.

4.6 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 § 58 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 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$. 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 7,9-8,0 (da metodo deve essere pH = 6-9), la concentrazione di ossigeno è di circa 9,4-9,6 mgO₂/L (deve essere > 3 mg/L all'inizio del test).

Durata

La durata del test è stata di 21 giorni, dal 26/09/2019 al 17/10/2019, 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	26/09/2019	28/09/2019	30/09/2019	02/10/2019	04/10/2019	07/10/2019	09/10/2019	11/10/2019	14/10/2019	17/10/2019	Somma	Media bianco	DS
1	0	0	0	0	13	28	38	0	38	61	178	32.4	22.1
2	0	0	0	0	0	61	1	42	44	54	202	36.7	26.4
3	0	0	0	0	0	32	46	31	39	62	210	38.2	23.7
4	0	0	0	0	0	20	33	0	29	29	111	20.2	14.7
5	0	0	0	0	16	32	52	0	49	63	212	38.5	25.5
6	0	0	0	0	12	30	47	1	52	63	205	37.3	25.2
7	0	0	0	0	0	221	32	28	34	37	352	64.0	67.3
8	0	0	0	0	14	28	56	0	32	61	191	34.7	24.1
9	0	0	0	0	0	2	9	11	8	15	45	8.2	5.7
10	0	0	0	0	13	31	2	41	54	29	170	30.9	20.2
Somma	0	0	0	0	68	485	316	154	379	474			
Media	0	0	0	0	6.8	48.5	31.6	15.4	37.9	47.4			
DS	0.00	0.00	0.00	0.00	7.24	62.29	20.61	18.08	13.51	18.10			

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

Replica campione	26/09/2019	28/09/2019	30/09/2019	02/10/2019	04/10/2019	07/10/2019	09/10/2019	11/10/2019	14/10/2019	17/10/2019	Somma campione	Media campione	DS campione
1	0	0	0	0	19	28	36	0	52	51	186	33.8	21.8
2	0	0	0	0	16	26	36	0	50	27	155	28.2	18.4
3	0	0	0	0	9	22	0	38	37	0	106	19.3	15.8
4	0	0	0	0	0	22	38	32	31	33	156	28.4	16.9
5	0	0	0	0	21	27	0	45	54	32	179	32.5	20.9
6	0	0	0	0	0	32	35	26	29	49	171	31.1	19.0
7	0	0	0	0	0	25	29	30	39	55	178	32.4	20.4
8	0	0	0	0	0	28	42	29	3	40	142	25.8	18.2
9	0	0	0	0	0	23	23	27	32	42	147	26.7	16.4
10	0	0	0	0	16	20	39	1	54	71	201	36.5	26.0
Somma	0	0	0	0	81	253	278	228	381	400			
Media	0	0	0	0	8.1	25.3	27.8	22.8	38.1	40.0			
DS	0.00	0.00	0.00	0.00	9.06	3.62	15.59	16.47	15.79	19.07			

Le caselle vuote corrispondono alla morte del progenitore che è da considerarsi casuale; pertanto, la valutazione statistica viene eseguita su un numero minore di repliche ai sensi del § 51 dell'OECD 211:2012

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 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	32.4	33.8
2	36.7	28.2
3	38.2	19.3
4	20.2	28.4
5	38.5	32.5
6	37.3	31.1
7	64.0	32.4
8	34.7	25.8
9	8.2	26.7
10	30.9	36.5

Test F a due campioni per varianze		
	Media bianco	Media campione
Media	34.10909091	29.47272727
Varianza	202.9399449	24.128191
Osservazioni	10	10
gdl	9	9
F	8.410905936	
P(F<=f) una coda	0.002004567	
F critico una coda	3.178893104	

Test t: due campioni assumendo varianze diverse		
	Media bianco	Media campione
Media	34.10909091	29.47272727
Varianza	202.9399449	24.128191
Osservazioni	10	10
Differenza ipotizzata per le medie	0	
gdl	11	
Stat t	0.972969874	
P(T<=t) una coda	0.175739164	
t critico una coda	1.795884819	
P(T<=t) due code	0.351478327	
t critico due code	2.20098516	

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. Possiamo, quindi, affermare che alla concentrazione limite testata di 1 mg/L il campione non ha influenza sulla riproduzione di *Daphnia magna* Straus, ovvero avremo la $CE_{50} > 1$ mg/L e la $NOEC > 1$ mg/L.

6.1 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 ciascuna animale sopravvissuto alla fine del test ≥ 60 .

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

7. Conclusioni

Il REGOLAMENTO (CE) N. 1272/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele riporta al punto 4.1.2.6. i criteri per la classificazione e la categorizzazione delle sostanze come «pericolose per l'ambiente acquatico» sintetizzati nella Tabella 4.1.0. (vedi di seguito), dove vengono indicate anche le modalità per l'attribuzione delle Categorie 1-4 di tossicità cronica.

Alla concentrazione limite di 1 mg/L il campione non ha effetto sulla riproduzione di *Daphnia magna* Straus. Non sono calcolabili con precisione la CE₅₀ (concentrazione con riduzione della prole del 50%) e la NOEC (No Observed Effect Concentration), comunque saranno entrambe maggiori di 1 mg/L. Pertanto, il campione non presenta tossicità a lungo termine per l'ambiente acquatico (tossicità cronica per i crostacei), non rientrando in alcuna delle categorie di cui al punto b-i) della succitata Tabella 4.1.0 e neppure nella Categoria 4 "rete di sicurezza".

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 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 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"

Tab. 4.1.0 *Categorie di classificazione delle sostanze pericolose per l'ambiente acquatico - REGOLAMENTO (CE) N. 1272/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al regolamento (CE) n. 1907/2006 (testo consolidato 2018), noto come regolamento CLP*

a) Pericolo a breve termine (acuto) per l'ambiente acquatico		
<u>Categoria Acuto 1:</u>	(Nota 1)	
CL ₅₀ a 96 ore (per i pesci)	≤ 1 mg/l e/o	
CE ₅₀ a 48 ore (per i crostacei)	≤ 1 mg/l e/o	
CrE ₅₀ a 72 o 96 ore (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 1 mg/l.	(Nota 2)
b) Pericolo a lungo termine (cronico) per l'ambiente acquatico		
i) Sostanze non rapidamente degradabili (Nota 3) per le quali sono disponibili dati adeguati sulla tossicità cronica		
<u>Categoria Cronico 1:</u>	(Nota 1)	
NOEC o EC _x cronica (per i pesci)	≤ 0,1 mg/l e/o	
NOEC o EC _x cronica (per i crostacei)	≤ 0,1 mg/l e/o	
NOEC o EC _x cronica (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 0,1 mg/l.	
<u>Categoria Cronico 2:</u>		
NOEC o EC _x cronica (per i pesci)	≤ 1 mg/l e/o	
NOEC o EC _x cronica (per i crostacei)	≤ 1 mg/l e/o	
NOEC o EC _x cronica (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 1 mg/l.	

(continua)

(continuazione)

ii) Sostanze rapidamente degradabili (Nota 3) per le quali sono disponibili dati adeguati sulla tossicità cronica

<u>Categoria Cronico 1:</u>	(Nota 1)
NOEC o EC _x cronica (per i pesci)	≤ 0,01 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per i crostacei)	≤ 0,01 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 0,01 mg/l.
<u>Categoria Cronico 2:</u>	
NOEC o EC _x cronica (per i pesci)	≤ 0,1 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per i crostacei)	≤ 0,1 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 0,1 mg/l.
<u>Categoria Cronico 3:</u>	
NOEC o EC _x cronica (per i pesci)	≤ 1 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per i crostacei)	≤ 1 mg/l e/o
NOEC o EC _x cronica (per le alghe o altre piante acquatiche)	≤ 1 mg/l.

(continua)

(continuazione)

iii) Sostanze per le quali non sono disponibili dati adeguati sulla tossicità cronica

Categoria Cronico 1: (Nota 1)

CL₅₀ a 96 ore (per i pesci) ≤ 1 mg/l e/o

CE₅₀ a 48 ore (per i crostacei) ≤ 1 mg/l e/o

CrE₅₀ a 72 o 96 ore (per le alghe o altre piante acquatiche) ≤ 1 mg/l. (Nota 2)

e la sostanza non è rapidamente degradabile e/o il BCF determinato in via sperimentale ≥ 500

(o, se non disponibile, il log K_{ow} ≥ 4). (Nota 3).

Categoria Cronico 2:

CL₅₀ a 96 ore (per i pesci) > 1 fino a ≤ 10 mg/l e/o

CE₅₀ a 48 ore (per i crostacei) > 1 fino a ≤ 10 mg/l e/o

CrE₅₀ a 72 o 96 ore (per le alghe o altre piante acquatiche) >1 fino a ≤ 10 mg/l. (Nota 2)

e la sostanza non è rapidamente degradabile e/o il BCF determinato in via sperimentale ≥ 500

(o, se non disponibile, il log K_{ow} ≥ 4). (Nota 3).

(continua)

(continuazione)

Categoria Cronico 3:

CL₅₀ a 96 ore (per i pesci) > 10 fino a ≤ 100 mg/l e/o

CE₅₀ a 48 ore (per i crostacei) > 10 fino a ≤ 100 mg/l e/o

CrE₅₀ a 72 o 96 ore (per le alghe o altre piante acquatiche) > 10 fino a ≤ 100 mg/l (Nota 2)

e la sostanza non è rapidamente degradabile e/o il BCF determinato in via sperimentale ≥ 500

(o, se non disponibile, il log K_{ow} ≥ 4). (Nota 3).

Classificazione «rete di sicurezza»

Categoria Cronico 4:

Casi nei quali i dati non consentono la classificazione in base ai criteri di cui sopra, ma sussistono comunque motivi di preoccupazione. In tali casi sono comprese, ad esempio, le sostanze scarsamente solubili per le quali non si registra tossicità acuta fino alle concentrazioni corrispondenti alla solubilità in acqua (Nota 4), che non sono rapidamente degradabili secondo il punto 4.1.2.9.5 e possiedono un fattore di bioconcentrazione determinato per via sperimentale BCF ≥ 500 (o, se non disponibile, un log K_{ow} ≥ 4), indicante un potenziale di bioaccumulo, che sono classificate in questa categoria, a meno che altri dati scientifici indichino che la classificazione non è necessaria. Tali dati comprendono le NOEC di tossicità cronica > solubilità nell'acqua o > 1 mg/l o altri dati di rapida degradazione nell'ambiente rispetto a quelli forniti dai metodi elencati al punto 4.1.2.9.5.

(continua)

(continuazione)

Nota 1

Quando si classificano sostanze nella categoria Acuto 1 e/o nella categoria Cronico 1 è necessario indicare anche un fattore moltiplicatore appropriato (cfr. tabella 4.1.3).

Nota 2

La classificazione si basa sulla CrE_{50} [= CE_{50} (tasso di crescita)]. Quando la base della CE_{50} non è specificata o non è registrata alcuna CrE_{50} , la classificazione si basa sul valore CE_{50} minimo disponibile.

Nota 3

Se non sono disponibili dati utili sulla degradabilità, siano essi determinati in via sperimentale o attraverso stime, la sostanza va considerata non rapidamente degradabile.

Nota 4

«Nessuna tossicità acuta» significa che la/le $C(E)L_{50}$ è/sono superiore/i alla solubilità in acqua. Questo vale anche per le sostanze scarsamente solubili (solubilità in acqua < 1 mg/l), per le quali esistono dati indicanti che il test di tossicità acuta non fornisce la misura reale della tossicità intrinseca.