

Genova, 21 febbraio 2011
Rev. 66 - IV - 17
del 23 - 2 - 11

Spett.le EMME DI SERVICE
Di Daniele D'Onofrio
Via dei Calzolari 7
57021 Venturina - Livorno

INDAGINE ECOTOSSICOLOGICA SUL PRODOTTO
“MISTER DRY A-500”

Il Responsabile del Laboratorio


(Prof. Luigi Pane)

Il Direttore del Dipartimento


(Prof. Mauro Vallarino)



RAPPORTO DI PROVA



A seguito della Vs. gentile richiesta e in riferimento agli accordi intercorsi tra il Dipartimento di Biologia (DIBIO) – Laboratorio di Ecotossicologia, dell'Università di Genova con sede in Genova, Viale Benedetto XV, 5 e Codesta Spett.le Società EMME DI SERVICE, con sede in Venturina (Livorno), via Dei Calzolari n.7, sono state effettuate alcune prove di ecotossicità su un campione del Vs. prodotto denominato "MISTER DRY A-500".

Di seguito vengono riportate alcune indicazioni sulla metodologia di indagine adottata; per ulteriori dettagli si rimanda ai metodi specifici indicati in seguito.

1. IDENTIFICAZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto denominato "MISTER DRY A-500" è costituito, per oltre il 99%, da allumino-silicati di calcio e magnesio; tutte le sostanze costituenti il prodotto sono state registrate ai sensi del regolamento REACH, CE-1907/2006.

Le principali proprietà fisiche e chimiche, dedotte da informazioni fornite dal produttore, sono riportate nella tabella 1.

Tabella 1. MISTER DRY A-500. Caratteristiche fisiche e chimiche del prodotto

Stato fisico	Solido granulare
Forma	Amorta
Odore	Nessuno
pH	Circa 8
Infiammabilità	Non infiammabile
Densità relativa	1-1,2 g/cm ³
Forma	Angolare; Sub angolare
Granulometria	Variabile
Solubilità in acqua	Trascurabile
Solubilità in acido fluoridrico	Si

Il prodotto è costituito da una miscela di sostanze solide che, in base ai criteri di classificazione, d'etichettatura e d'imballaggio delle sostanze e delle miscele, non soddisfa i requisiti per essere classificato come pericoloso ai sensi della direttiva 67/548/CEE, quindi non deve essere sottoposto al Regolamento CLP - CE 1272/2008 e pertanto non è soggetto a prescrizioni di etichettatura.

I singoli componenti del prodotto sono sostanze inorganiche non volatili insolubili sia in solventi polari che non polari; sono inoltre scarsamente idrolizzabili e non bioaccumulabili. Il prodotto a contatto con l'acqua dolce o marina potrebbe formare un percolato contenente piccole quantità di ioni inorganici e pertanto avere una certa rilevanza ecotossicologica.

Pertanto, questa indagine ha avuto come obiettivo la verifica degli effetti ecotossici di "elutriati" di MISTER DRY A-500 nei confronti di alcuni organismi-test acquatici e del suolo per la valutazione dell'ecocompatibilità ambientale di questo prodotto.

2. TEST EFFETTUATI



I test sono stati effettuati sulla matrice "elutriato" del prodotto e, in alcuni casi, anche sul "tal quale" per verificarne l'eventuale tossicità anche a seguito di contatto prolungato con un mezzo liquido. L'elutriato è stato preparato secondo il metodo USEPA 2001; in particolare, il prodotto è stato miscelato con acqua in rapporto 1:4, mantenuto in aggitatore per un'ora e quindi centrifugato. A partire dall'elutriato così ottenuto (100%) sono state effettuate diluizioni scalari con acqua (50%, 25%, 12,5%, 6,25%), dolce o marina (Instant Ocean®) a seconda dell'organismo utilizzato. La concentrazione di "MISTER DRY A-500" corrispondente al 100% di elutriato è risultata pari a 320 g/l (tabella 2).

Tabella 2. Elutriato di "MISTER DRY A-500" e corrispondenti concentrazioni.

DILUZIONI SCALARI	CONCENTRAZIONE
(%)	(g/l)
100	320
50	160
25	80
12,5	40
6,25	20

3. METODI DI RIFERIMENTO

I test ecotossicologici sono stati effettuati utilizzando diversi metodi di riferimento in considerazione dei diversi organismi utilizzati.

OECD (1984). Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 202: "Daphnia sp., Acute Immobilization Test and Reproduction Test".

ISO (1999). Water quality - Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea), N°14669.

IRSA-CNR (2005). Test di inibizione algale con *Selenastrum capricornutum* o *Pseudokirchneriella subcapitata*. Metodo spettrofotometrico. Istituto di Ricerca sulle Acque-CNR. Notiziario dei metodi analitici. Pagg. 1-8.

ISO (1995). Water quality - Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*. Reference number: N° 10253.

UNICIM (2003). Determinazione dell'inibizione e dell'allungamento radicale in *Cucumis sativus* L. (Cetriolo), *Lepidium sativum* L. (Crescione), *Sorghum saccharatum* Moench (Sorgo). N°1651.

USEPA (2001). Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual. EPA-823-B-01-002 October 2001. Chapter 5, Pp. 14-15.



4. AMBIENTE ED ORGANISMI UTILIZZATI

I test di tossicità acuta sono stati effettuati utilizzando i seguenti organismi:

- Acqua dolce
 - alga fitoplanctonica *Pseudokirchneriella subcapitata*
 - crostaceo cladocero *Daphnia magna*
- Acqua marina
 - alga fitoplanctonica *Dunaliella tertiolecta*
 - crostaceo copepode *Tigriopus fulvus*
- Suolo
 - pianta dicotiledone *Cucumis sativus*

4.1. Acqua dolce

Pseudokirchneriella subcapitata

Culture di *Pseudokirchneriella subcapitata* sono state mantenute in medium ISO 8692/89 alla temperatura di 23±2°C, con un ciclo luce-buio di 16-8 ore. Nei test sono state utilizzate colture in fase esponenziale. Per l'effettuazione dei test sull'elutriato sono state utilizzate piastre multipozzetto ed è stata adottata la seguente procedura: per ciascuna diluizione sono state allestite tre repliche per un totale di 15 test più tre controlli costituiti da terreno di coltura senza aggiunta della sostanza in esame. In ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di una soluzione di nutrienti ed un'opportuna aliquota del ceppo algale tale che la concentrazione iniziale in piastra risultasse di 5×10⁴ cell/ml. I parametri dei test sono riportati in tabella 3. L'endpoint (IC₅₀) è stato calcolato dopo 72 ore di incubazione valutando la densità algale mediante lettura spettrofotometrica a λ = 663 nm.

Tabella 3. Test di tossicità acuta con elutriato su *Pseudokirchneriella subcapitata*

Matrice	Elutriato
Diluizioni	100%, 50%, 12,5%, 6,25%
Numero di repliche	3
Volume di incubazione	10 ml
Densità algale a inizio test	5 × 10 ⁴
Durata del test	72 ore
Fotoperiodo	Luce continua
Temperatura	23±2°C
Intensità luminosa	8000 lux
End-point	Inibizione della crescita algale
Espressione del dato	IC ₅₀

Daphnia magna

Gli organismi utilizzati sono stati ottenuti a partire da eippipi (Microtox "Daphtoxokit"- Lottò DM281009-MicroBioTests Inc, Belgio) e conservati a 4°C fino all'allestimento del test.



Le colture di *Dunaliella tertiolecta* sono state mantenute in terreno di coltura Guillard f/2 a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, con un ciclo luce buio di 16-8 ore. I test sono stati effettuati in piastre multipozzetto, aggiungendo all'elutriato 40 μl di soluzione per terreno di coltura Guillard/f2 ed un'opportuna aliquota di alghe; contemporaneamente è stata allestita una serie di colture di controllo. Per ogni diluizione sono state effettuate 4 repliche; dopo 72 ore di incubazione è stata valutata la densità algale mediante metodo spettrofotometrico con lettura dell'assorbanza a 670 nm. I parametri dei test sono riportati in tabella 5.

Dunaliella tertiolecta

4.2. Acqua marina

Organismi	Età ≤ 24 ore
Matrice	Elutriato
Diluizioni	100%, 50%, 12,5%, 6,25%
Numero di repliche	4
Volume di incubazione	10 ml
Numero di organismi per replica	5
Durata del test	24/48 ore
Fotoperiodo	16L:8B
Temperatura	$20 \pm 2^\circ\text{C}$
End-point	Immobilizzazione
Espressione del dato	IC ₅₀

Tabella 4. Test di tossicità acuta con elutriato su *Daphnia magna*

I parametri dei test sono riportati in tabella 4. I tempi di estrazione. Per un'ulteriore verifica si è proceduto ad allestire un elutriato di "MISTER DRY A-500" più concentrato (1:1), corrispondente a 1284 g/l (vedi paragrafo 4), e ad allungare fino a 24 ore i secondi di osservazione, attività natatoria. esposizione. Sono stati considerati immobili gli organismi che non hanno mostrato, entro 15 di 120 organismi; come end-point è stata valutata la "immobilizzazione" dopo 24 e 48 ore di standard. Sono state effettuate 4 repliche utilizzando 5 organismi per diluizione per un totale di elutriato in ciascun pozzetto. Nei pozzetti di controllo era presente solo acqua ISO cestelli (SIGMA NetwellTM, porosità 74 μm), ponendo un'aliquota dell'opportuna diluizione Per l'effettuazione dei test sull'elutriato sono state utilizzate piastre multipozzetto dotate di di riferimento un sale di cromo ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Gli organismi sono stati sottoposti a test per la verifica dell'idoneità utilizzando come sostanza individui di età ≤ 24 ore dalla schiusa. illuminazione continua (6000-8000 lux); per l'effettuazione dei test sono stati utilizzati Gli eippi sono stati incubati in acqua dolce "ISO Standard", alla temperatura di $21 \pm 1^\circ\text{C}$, con

Organismi	Femmine ovigere omogenee per età
Matrice	Elutriato
Diluzioni	100%, 50%, 12,5%, 6,25%
Numero di repliche	3
Volume di incubazione	10 ml
Numero di organismi per replica	10
Durata del test	24/48/72/96 ore
Fotoperiodo	16L:8B
Temperatura	20±2°C
End-point	Mortalità
Espressione del dato	LC ₅₀

Tabella 6. Test di tossicità acuta con elutriato su femmine ovigere di *Tigriopus fulvus*

I test sono stati effettuati sia su nauplii sia su individui adulti (femmine ovigere). Analogamente a quanto descritto per i precedenti organismi, anche per *T. fulvus* tutti i test sono stati effettuati utilizzando piastre multipozzetto dotate di cestelli SIGMA NetworkTM (adulti) e Millicell-PCF (porosità = 12 µm) (nauplii). Per l'elutriato sono state effettuate 3 repliche di 10 organismi adulti (femmine ovigere omogenee per età) per diluizione oltre ai controlli per un totale di 180 organismi. Le diverse diluizioni dell'elutriato ed i test di controllo sono stati allestiti in acqua di mare artificiale Instant Ocean®. Come end-point è stata valutata la "mortalità" registrata dopo 24, 48, 72 e 96 ore di esposizione. I parametri dei test sono riportati in tabella 6.

I copepodi utilizzati nei test sono stati campionati nella zona costiera sopralittorale del Mar Ligure (Genova-Nervi), acclimatati in laboratorio in acqua di mare artificiale Instant Ocean® (salinità 37±0,5 PSU, temperatura 20±0,5 °C) opportunamente filtrata ed alimentati ad *libitum* con mangime commerciale (Salt Creek Feeds for Aquaculture, Salt Lake City, USA), alghe fitoplanctoniche (*Tetraselmis suecica*) e lievito commerciale (*Saccharomyces cerevisiae*). Un numero variabile di femmine ovigere è stato separato dall'allevamento di laboratorio per ottenere nauplii di età omogenea da utilizzare nei test di tossicità. La schiusa è stata stimolata staccando delicatamente i sacchi ovigeri maturi con aghi molto sottili dopo aver immobilizzato le femmine su filtri di lana di vetro (Whatman GF/F, porosità 0,45 µm) e lasciando una sottile pellicola d'acqua per evitare danni agli organismi.

Tigriopus fulvus

Matrice	Elutriato
Diluzioni	100%, 50%, 12,5%, 6,25%
Numero di repliche	4
Volume di incubazione	2 ml
Densità algale a inizio test	2 × 10 ³
Durata del test	72 ore
Fotoperiodo	Luce continua
Temperatura	20±2°C
Intensità luminosa	7000-8000 lux
End-point	Inibizione della crescita algale
Espressione del dato	IC ₅₀

Tabella 5. Test di tossicità acuta con elutriato su *Dunaliella tertiolecta*



Analoga procedura è stata utilizzata per i test con nauplii. I parametri dei test sono riportati in tabella 7.

Tabella 7. Test di tossicità acuta con elutriato su nauplii di *Tigriopus fulvus*

Organismi	Nauplii I-II stadio
Matrice	Elutriato
Diluzioni	100%, 50%, 12,5%, 6,25%
Numero di repliche	3
Volume di incubazione	2,5 ml
Numero di organismi per replica	10
Durata del test	24/48 ore
Fotoperiodo	16L:8B
Temperatura	20±2°C
End-point	Mortalità
Espressione del dato	LC ₅₀



Per i test su "MISTER DRY A-500" tal quale è stata effettuata analoga procedura; in particolare, in ciascun pozzetto è stata stratificata una quantità di prodotto corrispondente al rapporto di diluizione dell'elutriato (1:4).
I parametri dei test sono riportati in tabella 8.

Tabella 8. Test di tossicità acuta con "MISTER DRY A-500" tal quale su femmine ovigere di *Tigriopus fulvus*

Organismi	Femmine ovigere di età omogenea
Matrice	Sabbia tal quale
Diluzioni	-
Numero di repliche	3
Volume di incubazione	8 ml
Numero di organismi per replica	10
Durata del test	24/48/72/96 ore
Fotoperiodo	16L:8B
Temperatura	20±2°C
End-point	Mortalità
Espressione del dato	LC ₅₀

4.3. Suolo

Cucumis sativus

Per i test sono stati utilizzati semi commerciali a germinazione certificata.

Per l'effettuazione del test sull'elutriato sono state utilizzate piastre Petri di diametro 10 cm all'interno delle quali sono stati inseriti un filtro Whatman N°1, dieci semi di *Cucumis sativus* e sono state immerse opportune aliquote di ciascuna diluizione di elutriato preparato in acqua

deionizzata. Dopo 72 ore di incubazione è stato misurato il numero di semi germinati e l'allungamento radicale utili per calcolare la percentuale di germinazione (IG%). I parametri dei test sono riportati in tabella 9.

Tabella 9. Test di germinazione con elutriato su semi di *Cucumis sativus*

Matrice	Elutriato
Diluzioni!	100%-50%-12,5%-6,25%
Numero di repliche	4
Volume di incubazione	5 ml
Numero di semi per replica	10
Durata del test	72 ore
Fotoperiodo	Assenza di luce
Temperatura	25±1°C
End-point	Germinazione percentuale
Espressione del dato	IG%

5. RISULTATI

Per quanto riguarda l'ambiente d'acqua dolce, dai test effettuati con l'elutriato su *Pseudokirchneriella subcapitata* si è potuto mettere in evidenza una tossicità molto bassa (figura 1) e inferiore al 30% anche alle concentrazioni più elevate. Tali valori di inibizione, essendo inferiori al 50%, non hanno permesso il calcolo dell'IC₅₀.

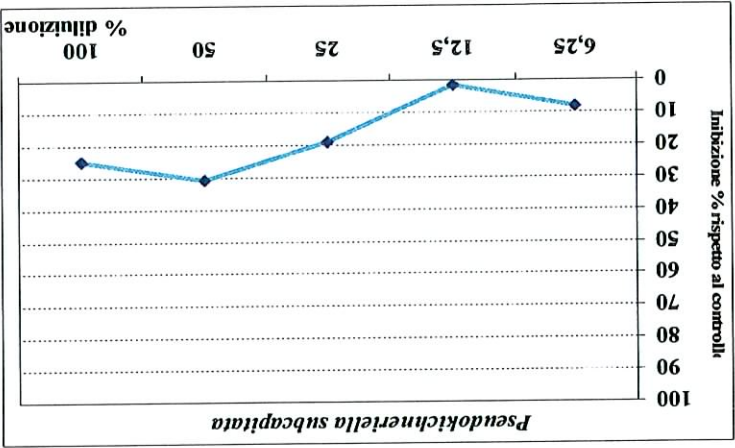


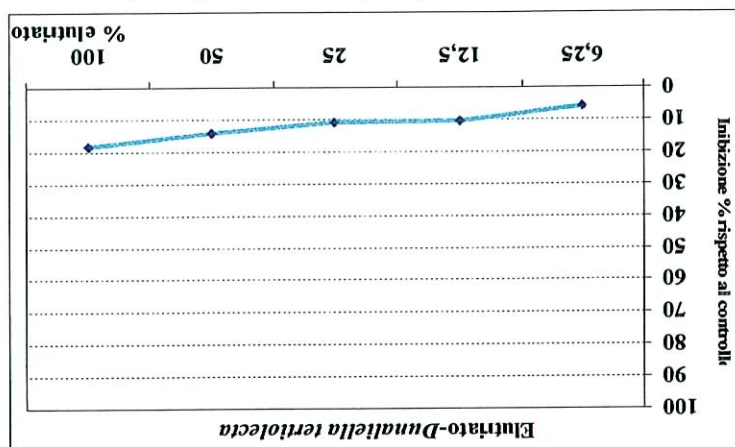
Fig. 1. Inibizione percentuale rispetto al controllo nel test su elutriato con *Pseudokirchneriella subcapitata* dopo 72 ore di esposizione.

Per quanto riguarda i test effettuati con l'elutriato su *Daphnia magna*, dai risultati riportati in figura 2 si può notare che le percentuali di immobilizzazione riscontrate sono molto basse e sempre inferiori, in media, al 10%, per cui sono paragonabili ai controlli. Di conseguenza, anche in questo caso, non è stato possibile calcolare la IC₅₀.



I test effettuati con elutriato su nauplii di *Tigriopus fulvus* (figura 4) hanno messo in evidenza una tossicità molto blanda dopo 24 e 48 ore di esposizione con valori di mortalità che non hanno mai raggiunto, in media, il 10% del totale. Anche in questo caso non è stato possibile calcolare il valore di LC_{50} poiché la mortalità è risultata inferiore al 50%.

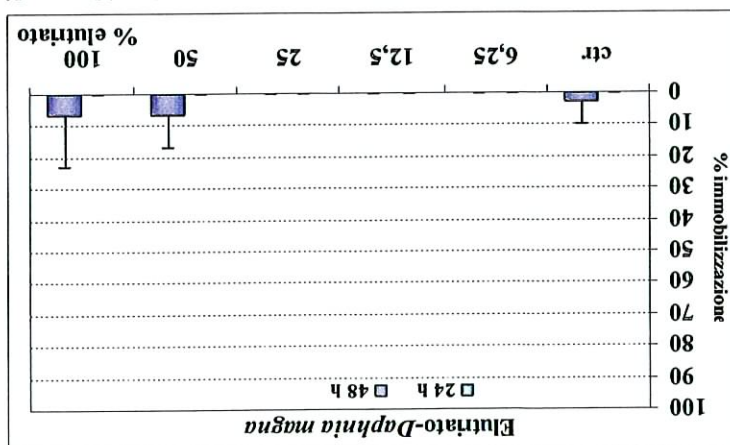
Fig. 3 – Inibizione percentuale rispetto al controllo nel test con elutriato su *Dunaliella tertiolecta* dopo 72 ore di esposizione.



Dai risultati dei test effettuati con elutriato sull'alga fitoplanctonica marina *Dunaliella tertiolecta* (figura 3) si può notare che l'inibizione percentuale della crescita rispetto al controllo è risultata sempre inferiore al 20% e pertanto la tossicità non è significativa anche alle concentrazioni maggiori ($P < 0,001$). Anche in questo caso, il valore di IC_{50} non è calcolabile.

Questi risultati sono stati confermati anche con i test con elutriato 1:1 (un'ora di agitazione) e con elutriato 1:4 (24 ore di agitazione) nei quali l'immobilizzazione di *Daphnia magna* è risultata pressoché nulla.

Fig. 2. *Daphnia magna*: % di immobilizzazione dopo 24 e 48 ore di esposizione e un'ora di agitazione (elutriato).

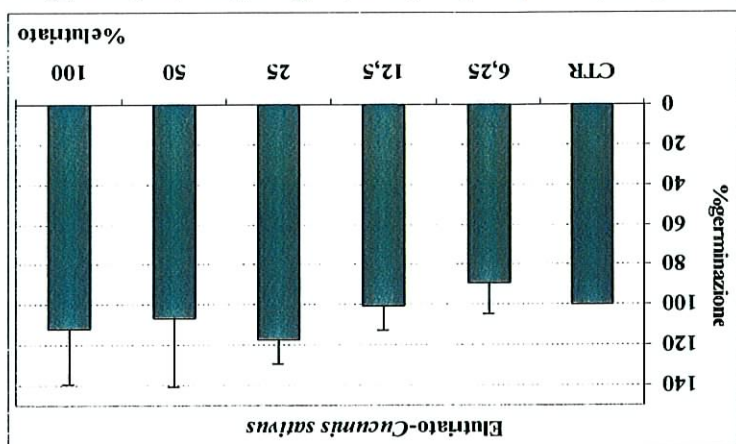


Dove possibile, i dati ottenuti sono stati elaborati dal punto di vista statistico, calcolando, per ciascun test, la media e la deviazione standard dei valori ottenuti nelle diverse repliche. Nei test con elutriato sono stati calcolati i valori di IC_{50} con il metodo dei Probit, LC_{50} con il Trimmed Spearman-Kärber method (TSK).

6. ELABORAZIONE STATISTICA

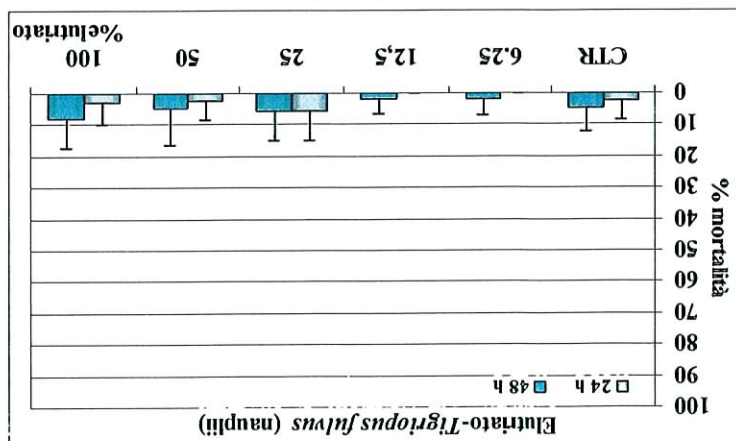
In generale, si evidenzia che tutti i test effettuati hanno soddisfatto le condizioni di validità indicate nei metodi.

Fig. 5. Indice di germinazione rispetto al controllo ottenuto dopo 72 ore di esposizione di semi di *Cucumis sativus* all'elutriato.



Sia i risultati relativi ai test effettuati su femmine ovigere di *Tigriopus fulvus* con elutriato sia quelli effettuati con "MISTER DRY A-500" tal quale non hanno mostrato mortalità negli organismi esposti. I risultati ottenuti nei test effettuati dopo esposizione di semi di *Cucumis sativus* all'elutriato sono riportati in figura 5. Si può osservare che l'indice di germinazione ottenuto è risultato sempre molto elevato ed ha evidenziato, alle concentrazioni $\geq 25\%$, un'attività stimolante la crescita.

Figura 4. Mortalità percentuale di nauplii di *Tigriopus fulvus* dopo test con elutriato (24 e 48 ore di esposizione).



7. CONCLUSIONI

Dal complesso dei dati ottenuti nel corso della sperimentazione si può concludere che il prodotto denominato "MISTER DRY A-500" non presenta effetti tossici per gli organismi saggiati.

Nella tabella 10 vengono riassunti i dati relativi ai test di ecotossicità effettuati; come si può notare, in tutte le situazioni saggate non è stato possibile calcolare il relativo end-point. Si possono indicare soltanto i valori di IC_{50} (maggiori di 320 g/l) e di IC_{50} (1284 g/l) corrispondenti alle diluizioni più elevate degli elutriati 1:4 e 1:1.

Tab.10 Risultati dei test effettuati su "MISTER DRY A-500". (n.c. non calcolabile)

Ambiente	Organismo	Frazione	Test	Risultato
Acqua dolce	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	elutriato	IC_{50} 72 ore	n.c.
	<i>Daphnia magna</i>	elutriato	IC_{50} 24 ore IC_{50} 48 ore	n.c. n.c.
Acqua marina	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	elutriato	IC_{50} 72 ore	n.c.
	<i>Tigriopus fulvus nauplii</i>	elutriato	LC_{50} 24 ore LC_{50} 48 ore	n.c. n.c.
	<i>Tigriopus fulvus</i> femm. ovigere	elutriato	LC_{50} 24 ore LC_{50} 48 ore LC_{50} 72 ore LC_{50} 96 ore	n.c. n.c. n.c. n.c.
	<i>Tigriopus fulvus</i> femm. ovigere	tal quale	% mortalità 24 ore	0
			% mortalità 48 ore	0
Suolo	<i>Cucumis sativus</i> semi	elutriato 6,25%	IG% 72 ore	88,8 %
		elutriato 12,5%		100,19 %
		elutriato 25%		116,9 %
		elutriato 50%		106,8 %
		elutriato 100%		112,1 %

Tenendo conto che nella sperimentazione sono state condotte anche prove di estrazione della matrice (con acqua) per tempi prolungati e che tali prove non hanno fornito risultati apprezzabili, si può affermare che il rischio ecotossicologico da rilascio di sostanze idrosolubili, a seguito di un eventuale contatto del prodotto con l'ambiente acquatico e con il suolo, appare del tutto trascurabile.

Genova, 21 febbraio 2011

