

RELAZIONE TECNICA

Saggi di ecogenotossicità per la determinazione della qualità delle acque del fiume Po e del suolo nei pressi della Centrale Termoelettrica “EP Centrale Ostiglia S.p.A.” di Ostiglia (MN)

Committente

TAUW Italia S.r.l.
Galleria Giovan Battista Gerace 14,
56124 Pisa
Italia

Laboratorio Incaricato

ChemService S.r.l. Controlli e Ricerche
Via F.lli Beltrami 15,
20026 Novate Milanese (MI)
Italia

Sommario

1	OBIETTIVO DELLO STUDIO.....	2
2	IDENTIFICAZIONE DEI CAMPIONI.....	4
3	PUNTI DI CAMPIONAMENTO - IMMAGINI	5
4	LINEE GUIDA E METODI UTILIZZATI.....	7
5	DEFINIZIONI	7
5.1	Test di Inibizione della Crescita Algale.....	7
5.2	Test di Tossicità Acuta su <i>Daphnia magna</i>	7
5.3	Test di Tossicità su Embrioni di Pesce <i>Danio rerio</i>	8
5.4	Test di Tossicità Acuta su <i>Eisenia fetida</i>	8
5.5	Test di Ames.....	8
6	FASE SPERIMENTALE SUI CAMPIONI DI SUOLO ED ELUTRIATI.....	9
6.1	Saggio di Tossicità Acuta sul Verme (<i>Eisenia fetida</i>)	9
6.1.1	Composizione del suolo artificiale.....	9
6.2	Preparazione dell’elutriato	11
6.3	Saggio di Tossicità Acuta su <i>Daphnia magna</i>	12
6.4	Saggio di Genotossicità – Test Di Ames	14
6.4.1	Test system	14
6.4.2	Procedura.....	15
6.4.3	Test preliminari	18
6.4.4	Validità dei controlli.....	18
7	FASE SPERIMENTALE SUI CAMPIONI DI ACQUA.....	22
7.1	Test di Inibizione della Crescita Algale.....	22
7.2	Saggio di Tossicità Acuta su <i>Daphnia magna</i>	26
7.3	Saggio di Tossicità Acuta su uova di pesce (<i>Danio rerio</i>).....	27
7.4	Saggio di Genotossicità – Test Di Ames	30
7.4.1	Test preliminari	30
7.4.2	Validità dei controlli.....	31
8	RISULTATI E CONCLUSIONI	34

1 OBIETTIVO DELLO STUDIO

Nella presente relazione sono riportati gli esiti dello studio ecogenotossicologico ante operam condotto in ottemperanza alla condizione ambientale n. 7 del Parere n. 114 del 25 giugno 2021 della Commissione Tecnica di Verifica dell'Impatto Ambientale – VIA e VAS allegato al Decreto del Ministro della Transizione Ecologica di concerto con il Ministro della Cultura n.354 del 12/08/2021 che ha espresso giudizio positivo di compatibilità ambientale per il progetto “Installazione di una nuova unità a ciclo combinato e interventi di miglioramento ambientale sui gruppi esistenti della Centrale di Ostiglia”, localizzato nel Comune di Ostiglia, in provincia di Mantova, proposto dalla EP Produzione S.p.A. (oggi EP Centrale Ostiglia S.p.A.).

In sintesi, il progetto prevede l'installazione, all'interno dell'area della Centrale esistente precedentemente occupata da un parco serbatoi PN2, di una nuova unità a ciclo combinato alimentata a gas naturale, denominata OS5, avente una potenza elettrica lorda di circa 896 MW e una potenza termica di combustione pari a circa 1.430 MW, e interventi di miglioramento ambientale sulle tre unità a ciclo combinato esistenti, consistenti nell'introduzione nelle relative caldaie a recupero di sistemi SCR per l'abbattimento catalitico degli ossidi di azoto. Il progetto prevede inoltre, a valle della realizzazione del nuovo ciclo combinato, la messa in riserva fredda della sezione 1 della centrale termoelettrica esistente, da attivare solo in caso di manutenzione o avaria di una delle altre unità (sezione 2, sezione 3 e OS5).

L'obiettivo dell'attività eseguita è stato quello di caratterizzare l'ecotossicità ed il potenziale mutagenico ante operam:

- del suolo nel territorio interessato dalle massime ricadute medie annue di particolato secondario generatosi a partire dalle emissioni di NO_x e NH₃ della stessa Centrale termoelettrica nella configurazione futura, a valle della realizzazione del sopraccitato progetto;
- dell'acqua del fiume Po, che costituisce il corpo recettore degli scarichi idrici della Centrale termoelettrica EP Centrale Ostiglia S.p.A. di Ostiglia (MN) nella configurazione attuale autorizzata, e in quella futura, a seguito della realizzazione del progetto “Centrale di Ostiglia: installazione di una nuova unità a Ciclo Combinato e interventi di miglioramento ambientale sui gruppi esistenti” che ha ricevuto parere positivo di compatibilità ambientale con Decreto del Ministro della Transizione Ecologica di concerto con il Ministro della Cultura n.354 del 12/08/2021.

Per effettuare l'indagine, sono stati prelevati due campioni di suolo (in due punti interessati dalle maggiori ricadute medie annue di particolato secondario stimate per lo scenario di progetto col modello di dispersione implementato nello Studio di Impatto Ambientale) e due campioni di acqua dal fiume Po (in due punti ubicati a monte e a valle degli scarichi idrici della Centrale sia nella configurazione attuale che in quella di progetto).

Sui campioni di suolo è stato valutato l'impatto sugli organismi terrestri e i possibili effetti della lisciviazione del suolo sugli organismi acquatici. A questo scopo è stato svolto uno studio di tossicità sul verme *Eisenia fetida* (per la valutazione degli effetti tossici acuti sul comparto terrestre) ed uno studio sul crostaceo cladocero *Daphnia magna Strauss* (per la valutazione degli effetti tossici acuti sul comparto acqua dovuto alla lisciviazione del suolo (elutriato)). Sul campione di acque da lisciviazione del suolo (elutriato) è stato inoltre valutato il potenziale mutagenico effettuando il test di Ames su due ceppi cellulari di *Salmonella typhimurium* (TA98-TA100) in presenza e assenza di una miscela di enzimi attivatori metabolici (S9).

Su entrambi i campioni di acqua è stata eseguita una batteria di ecotest rappresentativi di diversi livelli trofici. Gli studi di ecotossicità sono stati svolti sull'alga verde unicellulare *Pseudochirkneriella subcapitata* (per la valutazione degli effetti ecotossici acuti e cronici), sul crostaceo cladocero *Daphnia magna Strauss* (per la valutazione degli effetti ecotossici acuti) e su embrioni di pesce

della specie *Danio rerio* (per la valutazione degli effetti ecotossici acuti). Invece, il potenziale mutagenico è stato indagato effettuando il test di Ames con due ceppi batterici di *Salmonella typhimurium* (TA98 e TA100) in presenza e assenza di una miscela di enzimi attivatori metabolici (S9mix).

I risultati dei saggi ecogenotossicologici condotti in fase “ante operam” si sono resi necessari per determinare i valori di bianco da poter confrontare con gli esiti dei monitoraggi che saranno eseguiti durante la successiva fase di monitoring.

2 IDENTIFICAZIONE DEI CAMPIONI

Nelle tabelle 1 e 2 viene descritto come sono stati identificati i campioni analizzati.

Tabella 1: Identificazione campioni di suolo

Identificazione campione	Campionamento S1	Campionamento S2
Codice interno ChemService	CDS-23-623	CDS-23-624
Codice interno Elutriato	E- CDS-23-623	E- CDS-23-624
Data di prelievo e ricevimento in laboratorio	01/06/2023	
Orario di prelievo	9.30	10.00
Quantità	~ 20 kg	
Contenitore	Secchio	

Il prelievo di entrambi i campioni è stato effettuato a centrale esistente attiva. I campioni sono stati trasportati in contenitore refrigerato e stoccati a 4°C all'arrivo in laboratorio fino al momento dell'analisi.

Tabella 2: Identificazione campioni di acqua

Identificazione campione	Campionamento acqua a Valle	Campionamento acqua a Monte
Codice interno ChemService	CDS-23-625	CDS-23-626
Data di prelievo e ricevimento in laboratorio	01/06/2023	
Orario di prelievo	11.00	11.30
Quantità	2L	
Contenitore	Bottiglia HDPE	

Il prelievo di entrambi i campioni è stato effettuato a centrale esistente attiva. I campioni sono stati trasportati in contenitore refrigerato e congelati a -20°C all'arrivo in laboratorio fino al momento dell'analisi.

3 PUNTI DI CAMPIONAMENTO - IMMAGINI



Figura 1 Punti di campionamento del suolo rispetto alla centrale



Figura 2 Campionamento S1:
45.0652259 – 11.0969723



Figura 3 Campionamento S2:
45.0591271 – 11.0529817

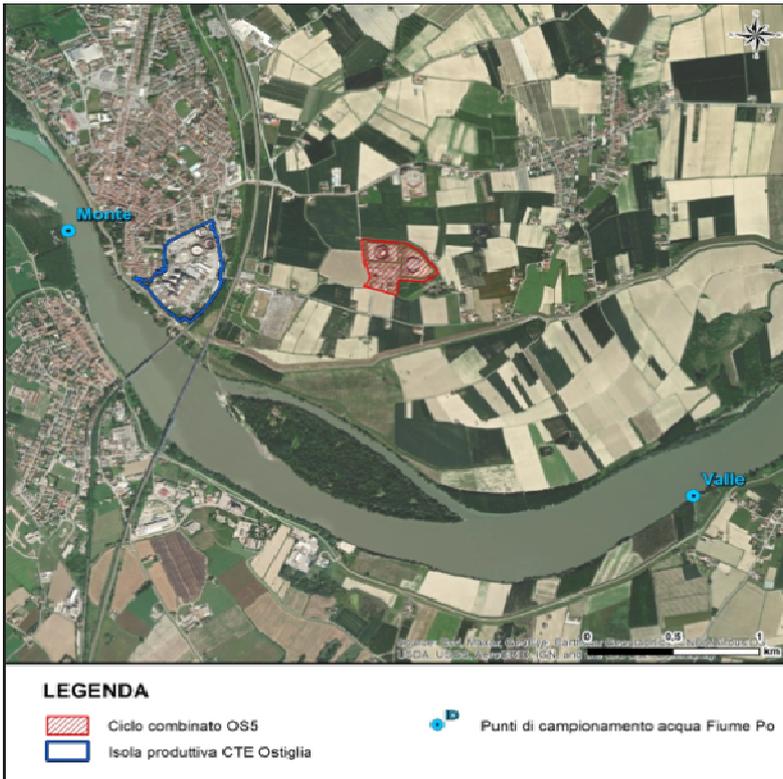


Figura 4 Punti di campionamento delle acque rispetto alla centrale



Figura 5 Campionamento a Valle della Centrale: 45.0472043 - 11.1752200



Figura 6 Campionamento a Monte della Centrale: 45.0635836 - 11.1293995

4 LINEE GUIDA E METODI UTILIZZATI

- OECD No. 201, 2011 - "Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test"
- OECD No. 202, 2004 - "*Daphnia sp.*, Acute Immobilization Test"
- OECD No. 207, 1984 – "Earthworm, Acute Toxicity Tests"
- OECD No. 236, 2013 - "Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test"
- APAT RTI CTN_SSC 2/2002, Guida Tecnica Su Metodi Di Analisi Per Il Suolo E I Siti Contaminati Utilizzo Di Indicatori Ecotossicologici E Biologici
- OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 4, No. 471, "Bacterial Reverse Mutation Test", adopted 21st July, 1997, Corrected 26th June 2020
- ISO 16240:2005. Water quality — Determination of the genotoxicity of water and waste water — Salmonella/microsome test (Ames test)

5 DEFINIZIONI

5.1 Test di Inibizione della Crescita Algale

Biomassa:	numero di cellule per millilitro (densità cellulare).
Crescita:	incremento della densità cellulare durante il periodo dello studio.
Tasso di crescita:	incremento in scala logaritmica dell'aumento della biomassa durante il periodo dello studio.
Yield:	valore della densità cellulare alla fine del periodo di esposizione a cui viene sottratta la densità cellulare all'inizio dello studio, per esprimere l'incremento della biomassa durante lo studio.
EC ₅₀	la concentrazione calcolata dell'elemento di prova che si traduce in un tasso di effetto del 50% sul tasso di crescita.
NOEC:	la concentrazione alla quale il campione non da effetti avversi sugli organismi sul tasso di crescita.
TQ:	campione tal quale.

5.2 Test di Tossicità Acuta su *Daphnia magna*

Immobilizzazione:	tutti gli organismi che non sono in grado di muoversi entro 15 secondi dopo leggera agitazione sono considerati immobili.
NOEC:	la concentrazione alla quale il campione non da effetti avversi sugli organismi.
TQ:	campione tal quale.

5.3 Test di Tossicità su Embrioni di Pesce *Danio rerio*

Effetto acuto: la tossicità acuta è rappresentata dalla morte degli organismi esposti. Le uova vengono considerate morte a 96h dall'inizio del test nei seguenti casi:

- Coagulazione dell'uovo
- Mancata presenza di somiti
- Mancato distacco della coda
- Mancanza di battito cardiaco

LC₅₀: la concentrazione calcolata dell'elemento di prova che si traduce in un tasso di mortalità del 50%.

TQ: campione tal quale.

5.4 Test di Tossicità Acuta su *Eisenia fetida*

Mortalità: mancanza di movimento in risposta a un preciso stimolo tattile all'estremità anteriore, inoltre, l'assenza di organismi nel terreno nel terreno recintato è considerata come morte, poiché gli organismi del test si disintegrano rapidamente dopo la morte.

LC₅₀: la concentrazione calcolata dell'elemento di prova che si traduce in un tasso di mortalità del 50%.

5.5 Test di Ames

Test di retromutazione o mutazione inversa (reverse mutation): saggio eseguito con ceppi batterici di *Salmonella typhimurium* che presentano una mutazione che li rende dipendenti da un aminoacido (istidina). Il saggio valuta la capacità del test item di retromutare i ceppi batterici nella loro forma selvatica (wild type) che non necessita dell'apporto esterno dell'amminoacido per la loro sopravvivenza. Un composto mutageno, revertendo la mutazione, genera un ceppo in grado di crescere in un terreno privo dell'amminoacido essenziale formando colonie il cui numero viene rapportato al numero di colonie che crescono spontaneamente nel terreno senza il test item (revertanti spontanei). Il rapporto tra revertanti indotti e revertanti spontanei quantifica l'attività mutagena del test item.

Retromutazione: mutazione che, a partire da un fenotipo mutato, dà origine nuovamente a un fenotipo selvatico, non mutato.

I mutageni per sostituzione della coppia di basi (base pair substitution mutagens) sono agenti che causano un cambiamento di base nel DNA. In un test di reversione questo cambiamento può verificarsi nel sito della mutazione originale o in un secondo sito nel genoma batterico.

I mutageni per traslazione di sequenza (Frameshift mutagens) sono agenti che causano l'aggiunta o l'eliminazione di una o più coppie di basi dalla sequenza di DNA, modificando così il frame di lettura nell'RNA.

Colonie revertanti: aggregati batterici (colonie) che si generano nelle piastre a seguito di esposizione a sostanze o miscele con potenziale mutageno. Gli agenti mutageni, causando

retromutazione nel ceppo batterico utilizzato come test system, rendono i batteri indipendenti dall'apporto esterno di istidina o triptofano e quindi capaci di moltiplicarsi e formare colonie nel terreno di coltura. Il conteggio delle colonie revertanti è il parametro attraverso il quale viene determinato l'effetto mutageno di una sostanza in un test di reversione batterica.

6 FASE SPERIMENTALE SUI CAMPIONI DI SUOLO ED ELUTRIATI

Di seguito vengono descritti i saggi eco-genotossicologici eseguiti sui campioni di suolo e sugli elutriati prodotti da essi.

6.1 Saggio di Tossicità Acuta sul Verme (*Eisenia fetida*)

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

24 ore prima dell'inizio del test gli organismi da testare sono stati trasferiti nello stesso terreno utilizzato come controllo negativo del test al fine di permetterne l'acclimatazione.

Per lo svolgimento del saggio sono state preparate quattro repliche contenenti il campione tal quale di suolo (TQ) e quattro repliche contenenti il solo terreno artificiale (controllo negativo).

L'umidità del terreno (H) del controllo negativo è stata corretta fino a circa il 35% del peso secco aggiungendo acqua deionizzata come richiesto dalla linea guida OECD 207,1984.

Ogni replica è stata costituita da un contenitore di vetro contenente circa 750 g di terreno (di controllo negativo o campione) e 10 organismi adulti clitellati con peso compreso tra 0,3 g e 0,6 g. I contenitori così preparati sono stati incubati in condizioni controllate all'interno di una camera climatica. Dopo 14 giorni dall'inizio dell'esposizione, è stata registrata la mortalità degli organismi esposti.

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

6.1.1 Composizione del suolo artificiale

Il terreno artificiale per la preparazione del controllo negativo è stato preparato come descritto nella linea guida OECD 207,1984:

- 10% torba di sfagno (pH 3,5 - 4,5);
- 20% caolino;
- 70% sabbia silicea essiccata a granulometria fine.

I componenti sono stati seccati utilizzando una stufa a 105°C e poi uniti nelle corrette proporzioni. Per miscelare il terreno artificiale è stato utilizzato il miscelatore BakerMix 80. Alla miscela di terreno artificiale è stata aggiunta un'aliquota di acqua demineralizzata in modo da ottenere un'umidità di circa 35% del peso secco.

CAMPIONE: Campione S1
CODICE CHEMSERVICE: CDS-23-623

pH dei suoli:

Diluizione del campione	Valori Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	6.26 – 6.99
S1	7.42 – 7.80

umidità dei suoli:

Diluizione del campione	Valori Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	37.75 – 28.50
S1	29.54 – 26.34

Criteri di validità del controllo: Mortalità nel controllo: 0%
(accettabile se <10%)

Lo studio risulta valido in quanto il criterio di validità è stato rispettato.

Risultati biologici: Mortalità

Campione	Risultati a 14 giorni
	Mortalità
Controllo neg.	0/40
S1	0/40

CAMPIONE: Campione S2
CODICE CHEMSERVICE: CDS-23-624

pH dei suoli:

Diluizione del campione	Valori Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	6.26 – 6.99
S2	8.27 – 9.36

umidità dei suoli:

Diluizione del campione	Valori Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	37.75 – 28.50
S2	25.68 – 22.91

Criterio di validità del controllo: Mortalità nel controllo: 0% (accettabile se <10%)

Lo studio risulta valido in quanto il criterio di validità è stato rispettato.

Risultati biologici:

Mortalità

Campione	Risultati a 14 giorni
	Mortalità
Controllo neg.	0/40
S2	0/40

6.2 Preparazione dell'elutriato

La preparazione dell'elutriato è stata effettuata utilizzando il metodo APAT RTI CTN_SSC 2/2002 "Guida Tecnica Su Metodi Di Analisi Per Il Suolo E I Siti Contaminati Utilizzo Di Indicatori Ecotossicologici E Biologici".

Il contenuto di umidità presente all'interno del suolo è stato determinato dalla media di due aliquote di campione essiccate per 24 ore a 105°C.

Nel presente caso l'elutriato è stato preparato trasferendo un' aliquota di suolo (equivalente a 0.100 kg di campione secco) setacciato con setaccio a maglie di 4 mm all'interno di una bottiglia di vetro insieme ad acqua deionizzata corrispondente ad un rapporto L/S pari a 4 L/kg.

Tabella 3 Preparativa elutriato dei campioni S1 e S2

Campione	Umidità	g di campione	mL di H ₂ O
S1	18.85%	118.85 g	381.15 mL
S2	20.6%	120.6 g	379.4 mL

I campioni così preparati sono stati posti in agitazione con ancoretta magnetica per 30 minuti. Al termine dell'agitazione le sospensioni sono lasciate a sedimentare per 24 ore. Al termine della decantazione la quantità di particolato ancora presente in sospensione in entrambi i campioni è risultata talmente elevata da non permettere lo svolgimento dei test. I campioni sono quindi stati centrifugati a 4000g per 20 minuti al fine di separare la fase liquida da quella solida. Si è prelevato il liquido surnatante con il quale sono stati effettuati i saggi di tossicità e di mutagenicità. Le soluzioni risultanti apparivano limpide e presentavano una colorazione marrone.

6.3 Saggio di Tossicità Acuta su *Daphnia magna*

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

Per l’allevamento e la preparazione delle concentrazioni diluite da testare, è stata utilizzata acqua ricostituita preparata in accordo alla linea guida OECD 202, 2004

<u>Soluzioni stock</u>	<u>Concentrazione nella soluzione stock</u>
CaCl ₂ 2H ₂ O	11.76 g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	4.93 g/L
NaHCO ₃	2.59 g/L
KCl	0.23 g/L

L’acqua ricostituita è stata preparata aggiungendo 25 mL di ogni soluzione stock in un volume finale di 1000 mL di acqua deionizzata.

Sono state preparate quattro repliche contenenti il campione tal quale da testare (TQ) e quattro repliche contenenti la sola acqua ricostituita (controllo negativo). In ogni replica sono stati introdotti 5 dafnidi di età inferiore a 24 ore.

I beaker così preparati sono stati incubati in condizioni controllate all’interno di una camera climatica.

Dopo 24 e dopo 48 ore dall’inizio dell’esposizione, è stata registrata l’immobilizzazione ed i risultati sono stati analizzati per calcolare il valore di NOEC.

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

CAMPIONE: Elutriato S1
CODICE CHEMSERVICE: E- CDS-23-623

pH delle soluzioni:

Diluizione del campione	Valori Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	7.98 – 7.78
TQ	8.00 – 8.12

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

Concentrazione di ossigeno disciolto:

Diluizione del campione	Valori (mg/L) Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	6.87 – 7.23
TQ	5.60 – 6.28

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

Criteri di validità del test:

*Nel controllo l'immobilizzazione delle dafnie non deve superare il 10%

*Il pH non deve variare più di 1.5 unità al termine del test

*La concentrazione dell'ossigeno disciolto deve essere ≥ 3 mg/l alla fine del saggio

Lo studio risulta valido in quanto tutti i criteri di validità sono stati rispettati.

Risultati biologici:

Immobilizzazione

Tempo di esposizione (h)	Concentrazione del campione (mg/L)	Organismi esposti	Organismi immobilizzati	Percentuale di immobilizzazione (%)
48	0.0 (controllo neg.)	20	0	0
	TQ	20	0	0

CAMPIONE: Elutriato S2
CODICE CHEMSERVICE: E- CDS-23-624

pH delle soluzioni:

Diluizione del campione	Valori Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	7.98 – 7.78
TQ	8.22 – 8.16

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

Concentrazione di ossigeno disciolto:

Diluizione del campione	Valori (mg/L) Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	6.87 – 7.23
TQ	5.41 – 6.61

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

Criteria di validità del test:

*Nel controllo l'immobilizzazione delle dafnie non deve superare il 10%

*Il pH non deve variare più di 1.5 unità al termine del test

*La concentrazione dell'ossigeno disciolto deve essere ≥ 3 mg/l alla fine del saggio

Lo studio risulta valido in quanto tutti i criteri di validità sono stati rispettati.

Risultati biologici: Immobilizzazione

Tempo di esposizione (h)	Concentrazione del campione (mg/L)	Organismi esposti	Organismi immobilizzati	Percentuale di immobilizzazione (%)
48	0.0 (controllo neg.)	20	0	0
	TQ	20	0	0

6.4 Saggio di Genotossicità – Test Di Ames

Il potenziale mutagenico dei campioni è stato valutato mediante test di retromutazione batterica (test di Ames) con i ceppi batterici TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* in presenza e assenza di una miscela di enzimi attivatori metabolici (S9mix) con protocollo di pre-incubazione.

Il test di Ames è stato effettuato secondo quanto descritto dall'OECD 417 "Bacterial Reverse Mutation Test" applicando la metodica di pre-incubazione e utilizzando i ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium*.

L'obiettivo del test è la determinazione del numero di colonie nelle piastre esposte al trattamento con i campioni in esame, in presenza e assenza di una miscela di enzimi attivatori metabolici (S9).

6.4.1 Test system

I ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* utilizzati nel test sono stati ottenuti in forma liofilizzata da:

Fornitore: Trinova Biochem GmbH; Rathenau Str. 2; D-35394 Giessen, Germany;
Produttore: MOLTOX INC., P.O. BOX 1189; BOONE, NC 28607 USA.

Tabella 4: identificativi delle colture cellulari utilizzate

Ceppo	Data di arrivo	Lotto	Scadenza
TA98	20/12/22	5639D	09/03/2024
TA100	20/12/22	5638D	02/03/2024

6.4.2 Procedura

Prove preliminari

Per valutare eventuali interferenze legate alla precipitazione dei campioni nelle piastre del test, si è proceduta ad una prova di solubilità preliminare nel tampone fosfato, nella miscela di enzimi attivatori metabolici e nel top agar completo.

Inoculo

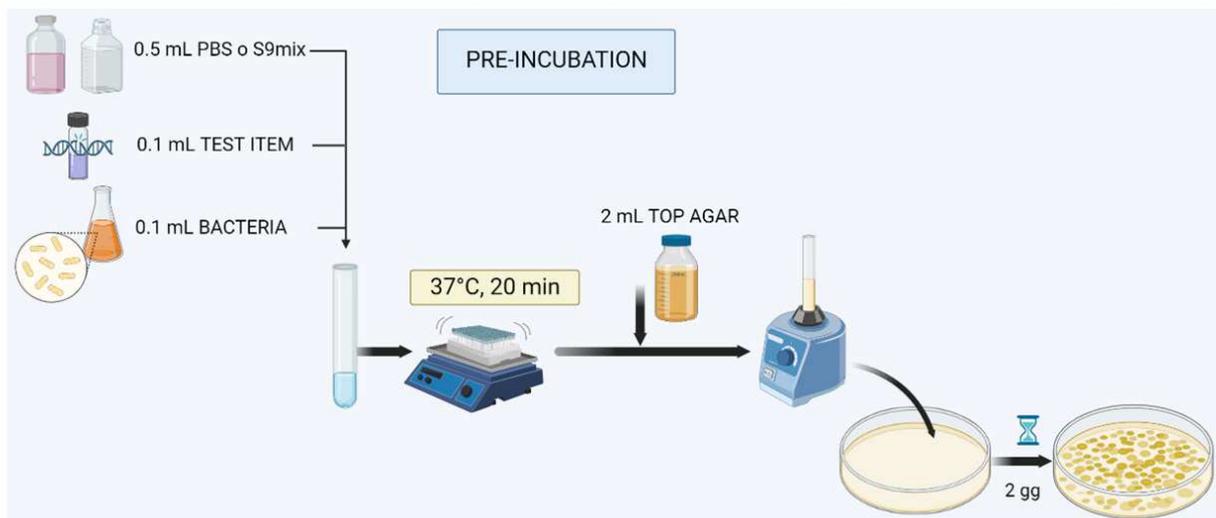
Ciascun ceppo batterico è stato incubato in Nutrient Broth No 2 (25 mL) per circa 12-14 ore a 37°C in modo da utilizzare nel test culture in fase di replicazione esponenziale. Per ciascun ceppo è stata allestita una coltura in flask sterile con tappo ventilato.

NUTRIENT BROTH NO.2 Produttore: Oxoid Limited
Lot: 3393549
Scadenza: 31.12.2026

Al termine dell'incubazione, ciascuna coltura è mantenuta a temperatura ambiente e l'avvenuta crescita è stata verificata mediante ispezione visiva per presenza di torbidità e successivamente lettura spettrofotometrica a 650 nm per verificare il raggiungimento di un valore di OD650 tra 1.0 e 1.4. Verificata l'avvenuta crescita si procede alla preparazione del top agar completo.

Pre-incubation test

La metodica di pre-incubazione consiste nel porre i batteri a contatto con il test item prima dell'aggiunta del top agar e della successiva distribuzione sulle piastre Petri. La pre-incubazione dura 20 minuti e viene svolta a 37°C con agitazione. Per ciascuna condizione sperimentale sono state eseguite 3 repliche.



La soluzione di pre-incubazione è stata preparata come di seguito riportato:

Test item o sostanza di riferimento	100 µL
Inoculo batterico	100 µL
Tampone fosfato o S9 mix	500 µL

Al termine del periodo di incubazione, in ciascuna replica sono stati aggiunti 2 mL di top agar liquido e si è proceduto ad una rapida agitazione con vortex prima di versare il contenuto della provetta sulla superficie di una piastra di Minimal Glucose Agar (MGA).

Piastre di minimal glucose agar (MGA) Ready-to-use

Fornitore: Trinova Biochem GmbH; Rathenau Str. 2; D-35394 Giessen, Germany;

Produttore: MOLTOX INC., P.O. BOX 1189; BOONE, NC 28607 USA.

Lot No.: 60491 Expiry date: 23/09/2023

Una volta solidificato il top agar, le piastre sono state incubate a 37°C per circa 48 ore.

Concentrazioni testate

Sono state testate 5 concentrazioni di ciascun campione (acque ed elutriato dei sedimenti) a partire del campione tal quale (100%), successivamente diluito con acqua ultrapura sterile. Le concentrazioni testate sono state: 100% - 50% - 16% - 5% e 1.6%.

Conta delle colonie

Al termine del periodo di incubazione si è proceduto alla conta delle colonie in ciascun gruppo sperimentale. La procedura è stata condotta con conta manuale.

Si è proceduto quindi alla derivazione della conta media di ogni condizione sperimentale e si è proceduto poi al calcolo del Tasso di Mutazione (Mutation Rate, MR) come rapporto tra il numero di colonie nel trattato e il numero di colonie nel controllo negativo.

$$\text{Tasso di mutazione} = \frac{\text{Numero medio di colonie nel trattato}}{\text{Numero medio di colonie nel controllo negativo}}$$

Attivazione metabolica

Il test è stato condotto in presenza e assenza di un attivatore metabolico (S9mix) ovvero la frazione S9 ottenuta da fegati di ratti trattati con Phenobarbital/ β -naphthoflavone mixata ad alcuni cofattori per simulare il metabolismo in vitro.

I riferimenti per la miscela S9mix utilizzata sono:

Fornitore: Trinova Biochem GmbH, Rathenau Str. 2; D-35394 Giessen, Germany;

Produttore: MOLTOX INC., P.O. BOX 1189; BOONE, NC 28607 USA.

Lotto: 4696 Scadenza: 07/03/2025

Controlli positivi

È stato preparato un controllo positivo con una sostanza di riferimento specifico per ogni condizione sperimentale (ceppo batterico e presenza/assenza di S9mix) così da dimostrare la sensibilità dei ceppi utilizzati nel saggio. In tabella 5 sono riportati i controlli positivi utilizzati nelle diverse condizioni sperimentali oggetto di studio.

Tabella 5 Sommario dei controlli positivi

Sostanza di riferimento	Veicolo	Concentrazione	Ceppo batterico	Attivazione metabolica
2-Nitrofluorene	DMSO	1 µg/plate	TA98	No (-)
Sodium azide (SAZ)	Acqua ultrapura	1 µg/plate	TA100	No (-)
2-aminoanthracene (2AA)	DMSO	1 µg/plate	TA98	Sì (+)
		2 µg/plate	TA100	Sì (+)

Controllo negativo

Nel presente studio, il controllo negativo è rappresentato da acqua ultrapura, la stessa utilizzata anche per le diluizioni dei 4 campioni in esame.

Criteri di validità

Il test è considerato valido se:

- il numero di revertanti spontanei nel controllo negativo risulta comparabile con il range di dati storici ottenuti in laboratorio;
- il batch di S9 usato nello studio mostra l'appropriata attività biologica;
- il controllo positivo induce un incremento del numero di colonie di almeno 3 volte il valore medio del controllo negativo;

Una concentrazione è considerata tossica se nelle piastre si verifica un ridotto o assente prato di fondo e un numero di colonie ridotto (inferiore al 70%) rispetto al controllo negativo e inferiore ai valori storici del controllo negativo.

Criteri di mutagenesi

Un campione viene considerato mutageno se:

- viene osservato un incremento del numero di colonie revertanti concentrazione-dipendente e/o
- una riproducibile risposta positiva biologicamente rilevante viene osservata alla più alta concentrazione in almeno un ceppo, con o senza attivatore metabolico.

Un incremento è considerato biologicamente rilevante se il numero di colonie revertanti è almeno il doppio del numero ottenuto nei controlli negativi dello studio, ovvero quando il Mutation Rate è uguale o superiore a 2.

Un campione è considerato non mutageno se non produce un incremento concentrazione-dipendente del numero di revertanti e non produce una risposta biologicamente rilevante in alcuna concentrazione testata con o senza attivatore metabolico.

6.4.3 Test preliminari

Il test di precipitazione preliminare è stato condotto miscelando 100 µL di ciascun campione con 500 µL di tampone fosfato o di S9mix rispettivamente per la prova condotta senza e con attivazione metabolica.

In assenza di precipitazione o altra alterazione visibile ad occhio nudo, a ciascuna soluzione sono stati addizionati 2 mL di top agar e si è piastrata la soluzione risultante. Avvenuta la solidificazione del top agar, le piastre sono state poste in incubatore per 2-4 ore e successivamente le piastre sono state osservate per la presenza di depositi o alterazioni visibili a occhio nudo.

Tabella 6 comportamento dei campioni nelle condizioni test

Campione	Concentrazione (% v/v)	Apparenza della miscela	Apparenza della piastra post incubazione
Elutriato Sedimento S1	100	Soluzione limpida e trasparente, assenza di precipitato	La piastra non presenta alterazioni o depositi visibili.
Elutriato Sedimento S2	100	Soluzione limpida e trasparente, assenza di precipitato	La piastra non presenta alterazioni o depositi visibili.

Non sono state registrate alterazioni o precipitati visibili ad occhio nudo testando ciascun campione tal quale (100%), sia in presenza che in assenza di attivatore metabolico.

6.4.4 Validità dei controlli

Il numero di colonie revertanti spontanee nei controlli negativi (acqua ultrapura) e nei controlli positivi (2-nitrofluorene, sodium azide e 2-aminoanthracene), con e senza attivazione metabolica (S9), è in linea con il range storico dei controlli. Inoltre, i controlli positivi hanno indotto un incremento del numero di colonie revertanti tale per cui il Mutation rate risultante è maggiore di 3.

PRE-INCUBATION					
Negative Control			Positive Control		
S9-					
Parameter	TA98	TA100	Parameter	TA98	TA100
Mean	13,8	72,7	Mean	141,1	395,2
SD	5,7	6,3	SD	30	115,1
Min	3	62	Min	88	253
Max	25	86	Max	202	547
S9+					
Parameter	TA98	TA100	Parameter	TA98	TA100
Mean	17,3	103,9	Mean	232,4	605
SD	4,3	14,9	SD	76,1	132,4
Min	10	81	Min	120	400
Max	27	136	Max	372	800

Il batch di S9 utilizzato ha mostrato ad un'appropriata attività biologica, come da certificato.

Non si sono verificate contaminazioni nelle repliche sperimentali.

Tutti i criteri di validità risultano quindi rispettati ed il test è considerato valido.

CAMPIONE: Elutriato Sedimento S1
CODICE CHEMSERVICE E- CDS-23-623

Nelle Tabelle 7 e 8 sono riportati i risultati ottenuti rispettivamente sui ceppi TA98 e TA100, in assenza (S9-) e presenza (S9+) di attivazione metabolica.

Tabella 7 Risultati del test sull'elutriato del Sedimento S1 con *S. typhimurium* TA98

TA98									
	Test Concentration (%)	REPLICATE				ELABORATION		ASSESSMENT	
		1	2	3	4	MEAN	SD	MUTATION RATE	ALERT
S9-	Negative Control	7	10	18		11,7	5,7	1,00	No
	100	15	13	14		14,0	1,0	1,20	No
	50	10	14	9		11,0	2,6	0,94	No
	16	9	11	14		11,3	2,5	0,97	No
	5	8	13	12		11,0	2,6	0,94	No
	1,6	12	10	14		12,0	2,0	1,03	No
	Positive Control (PC)	125	134	178		145,7	28,4	12,49	Yes
S9+	EXPERIMENTAL GROUP	REPLICATE				ELABORATION		ASSESSMENT	
		1	2	3	4	MEAN	SD	MUTATION RATE	ALERT
	Negative Control	16	10	13		13,0	3,0	1,00	No
	100	18	17	15		16,7	1,5	1,28	No
	50	11	12	15		12,7	2,1	0,97	No
	16	13	11	15		13,0	2,0	1,00	No
	5	11	13	13		12,3	1,2	0,95	No
1,6	15	11	13		13,0	2,0	1,00	No	
	Positive Control (PC)	88	80	130		99,3	26,9	7,64	Yes

Tabella 8 Risultati del test sull'elutriato del Sedimento S1 con *S. typhimurium* TA100

TA100									
	Test Concentration (%)	REPLICATE				ELABORATION		ASSESSMENT	
		1	2	3	4	MEAN	SD	MUTATION RATE	ALERT
S9-	Negative Control	90	82	80		84,0	5,3	1,00	No
	100	85	80	74		79,7	5,5	0,95	No
	50	82	94	85		87,0	6,2	1,04	No
	16	88	81	84		84,3	3,5	1,00	No
	5	91	78	83		84,0	6,6	1,00	No
	1,6	91	84	81		85,3	5,1	1,02	No
	Positive Control (PC)	440	421	430		430,3	9,5	5,12	Yes
S9+	EXPERIMENTAL GROUP	REPLICATE				ELABORATION		ASSESSMENT	
		1	2	3	4	MEAN	SD	MUTATION RATE	ALERT
	Negative Control	83	85	81		83,0	2,0	1,00	No
	100	76	73	76		75,0	1,7	0,90	No
	50	88	84	95		89,0	5,6	1,07	No
	16	81	84	84		83,0	1,7	1,00	No
	5	83	83	82		82,7	0,6	1,00	No
	1,6	84	85	80		83,0	2,6	1,00	No
Positive Control (PC)	575	760	605		646,7	99,3	7,79	Yes	

Dallo studio condotto sull'elutriato del campione di Sedimento S1 non sono emerse evidenze di genotossicità nelle condizioni sperimentali adottate.

CAMPIONE: Elutriato Sedimento S2
CODICE CHEMSERVICE E- CDS-23-624

Nelle Tabelle 9 e 10 sono riportati i risultati ottenuti rispettivamente sui ceppi TA98 e TA100, in assenza (S9-) e presenza (S9+) di attivazione metabolica.

Tabella 9 Risultati del test sull'elutriato del Sedimento S2 con *S. typhimurium* TA98

TA98									
	Test Concentration (%)	REPLICATE				ELABORATION		ASSESSMENT	
		1	2	3	4	MEAN	SD	MUTATION RATE	ALERT
S9-	Negative Control	7	10	18		11,7	5,7	1,00	No
	100	11	16	21		16,0	5,0	1,37	No
	50	10	14	14		12,7	2,3	1,09	No
	16	10	11	15		12,0	2,6	1,03	No
	5	9	15	11		11,7	3,1	1,00	No
	1,6	11	12	13		12,0	1,0	1,03	No
	Positive Control (PC)	125	134	178		145,7	28,4	12,49	Yes
S9+	EXPERIMENTAL GROUP	REPLICATE				ELABORATION		ASSESSMENT	
		1	2	3	4	MEAN	SD	MUTATION RATE	ALERT
	Negative Control	16	10	13		13,0	3,0	1,00	No
	100	15	18	12		15,0	3,0	1,15	No
	50	12	13	11		12,0	1,0	0,92	No
	16	11	12	14		12,3	1,5	0,95	No
	5	12	15	11		12,7	2,1	0,97	No
	1,6	13	15	12		13,3	1,5	1,03	No
Positive Control (PC)	88	80	130		99,3	26,9	7,64	Yes	

Tabella 10 Risultati del test sull'elutriato del Sedimento S2 con *S. typhimurium* TA100

TA100										
	Test Concentration (%)	REPLICATE				ELABORATION		ASSESSMENT		
		1	2	3	4	MEAN	SD	MUTATION RATE	ALERT	
S9-	Negative Control	90	82	80		84,0	5,3	1,00	No	
		100	88	86	79	84,3	4,7	1,00	No	
		50	80	78	80	79,3	1,2	0,94	No	
		16	84	80	86	83,3	3,1	0,99	No	
		5	91	81	84	85,3	5,1	1,02	No	
		1,6	82	88	80	83,3	4,2	0,99	No	
	Positive Control (PC)	440	421	430		430,3	9,5	5,12	Yes	
S9+	EXPERIMENTAL GROUP	REPLICATE				ELABORATION		ASSESSMENT		
		1	2	3	4	MEAN	SD	MUTATION RATE	ALERT	
		Negative Control	83	85	81		83,0	2,0	1,00	No
			100	76	83	73	77,3	5,1	0,93	No
			50	81	75	78	78,0	3,0	0,94	No
			16	84	81	84	83,0	1,7	1,00	No
			5	85	82	84	83,7	1,5	1,01	No
	1,6		86	80	84	83,3	3,1	1,00	No	
Positive Control (PC)	575	760	605		646,7	99,3	7,79	Yes		

Dallo studio condotto sull'elutriato del campione di Sedimento S2 non sono emerse evidenze di genotossicità nelle condizioni sperimentali adottate.

7 FASE SPERIMENTALE SUI CAMPIONI DI ACQUA

Di seguito vengono riportati i saggi eco-genotossicologici eseguiti sui campioni di acqua.

7.1 Test di Inibizione della Crescita Algale

Il test di inibizione della crescita algale utilizzato per la valutazione degli effetti cronici è stato condotto seguendo il metodo descritto nella linea guida OECD No. 201, "Fresh water alga and cyanobacteria, growth inhibition test", 2011, utilizzando l'alga verde unicellulare della specie *Pseudokirchneriella subcapitata* acquistata originariamente da "Institute of Plant Physiology" dell'Università di Göttingen in Germania e mantenuta in coltura in laboratorio.

Per la coltura algale utilizzata come inculo per il test e per le diluizioni del campione ricostituito, è stato utilizzato il terreno di coltura "OECD medium" preparato secondo linea guida OECD 201, 2011, di seguito viene riportata la composizione:

Nutrienti

Concentrazione nelle soluzioni stock

Soluzione stock 1

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

Soluzione stock 2

FeCl ₃ *6H ₂ O	64 mg/L
Na ₂ EDTA*2H ₂ O	100 mg/L

Soluzione stock 3

H ₃ BO ₃	185 mg/L
MnCl ₂ *4H ₂ O	415 mg/L
ZnCl ₂	3 mg/L
CoCl ₂ *6H ₂ O	1.5 mg/L
CuCl ₂ *2H ₂ O	0.01 mg/L
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	7 mg/L

Soluzione stock 4

NaHCO ₃	50 g/L
--------------------	--------

A partire dalle soluzioni stock, il terreno algale è stato preparato aggiungendo a 500 mL di acqua deionizzata:

- 10 mL di soluzione stock 1
- 1 mL di soluzione stock 2
- 1 mL di soluzione stock 3
- 1 mL di soluzione stock 4,

e quindi portando al volume finale 1000 mL con acqua deionizzata.

Tre repliche per ogni diluizione effettuata (dil. 16, 8, 4 e 2) e per il campione tal quale (TQ), e sei repliche contenenti il solo terreno algale (controllo negativo) sono state inoculate con un volume noto di una coltura in crescita esponenziale in modo da avere una concentrazione iniziale di cellule pari a 10000 cellule/mL all'interno di ciascuna replica.

Le beute così preparate sono state incubate in condizioni controllate per un periodo di 72 ore in continua agitazione all'interno di una camera climatica.

Al termine del periodo di esposizione è stata misurata la densità cellulare mediante un contacellule elettronico. L'inibizione della crescita è stata determinata rispetto alla coltura di controllo.

Come previsto dalla linea guida, per l'organismo *Pseudochirkneriella subcapitata*, prima dell'inizio del saggio biologico, il campione acquoso è stato ricostituito con la stessa miscela di sali con cui è preparato il terreno di coltura algale.

Il campione, prima di essere utilizzato, è stato filtrato su lana di vetro al fine di eliminare il particolato grossolano presente, successivamente sono state preparate le diluizioni per ogni saggio biologico.

Durata dello studio: 72 ore

Intensità luminosa: tra 4400 e 8800 Lux
(illuminazione continua)

Temperature: tra 21 e 24 °C
(conforme al range raccomandato dalla OECD 201, 2011)

CAMPIONE: Campionamento acqua a Valle
CODICE CHEMSERVICE: CDS-23-625

pH delle soluzioni:

Diluizione del campione	Valori Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	8.28 – 9.34
dil. 16	8.27 – 9.36
dil. 8	8.26 – 9.42
dil. 4	8.20 – 9.44
dil. 2	8.17 – 9.30
TQ	8.14 – 9.14

Massima variazione del pH nel controllo: 1.24. Conforme al massimo incremento di 1.5 punti durante il saggio (OECD 201, 2011)

Criteri di validità del controllo:

Fattore di crescita della biomassa: 350
 (accettabile se ≥ 16);
 Variazione media della rata di crescita: 2.5 %
 (accettabile se ≤ 7)
 Coeff. di variazione giornaliero del tasso di crescita: 21.8 %
 (accettabile se $\leq 35\%$)

Lo studio risulta valido in quanto tutti i criteri di validità sono stati rispettati.

Risultati biologici:

Tasso di crescita e Yield dopo 72 ore di esposizione.

Diluizione del campione	Risultati a 72 ore			
	Yield	% inibizione della Yield	Tasso di crescita	% inibizione del tasso di crescita
Controllo neg.	3499556	-	1.9497	-
dil. 16	4037689	0	2.0002	0
dil. 8	3904622	0	1.9888	0
dil. 4	4035089	0	1.9997	0
dil. 2	3015022	13.9	1.8991	2.6
TQ	2551156	27.2	1.8411	5.6

CAMPIONE: Campionamento acqua a Monte
CODICE CHEMSERVICE: CDS-23-626

pH delle soluzioni:

Diluizione del campione	Valori Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	8.28 – 9.34
dil. 16	8.28 – 9.21
dil. 8	8.28 – 9.22
dil. 4	8.26 – 9.67
dil. 2	8.17 – 9.43
TQ	8.13 – 9.22

Massima variazione del pH nel controllo: 1.24. Conforme al massimo incremento di 1.5 punti durante il saggio (OECD 201, 2011)

Criteria di validità del controllo: Fattore di crescita della biomassa: 350
 (accettabile se ≥ 16);
 Variazione media della rata di crescita: 2.5 %
 (accettabile se ≤ 7)
 Coeff. di variazione giornaliero del tasso di crescita: 21.8 %
 (accettabile se $\leq 35\%$)

Lo studio risulta valido in quanto tutti i criteri di validità sono stati rispettati.

Risultati biologici: Tasso di crescita e Yield dopo 72 ore di esposizione.

Diluizione del campione	Risultati a 72 ore			
	Yield	% inibizione della Yield	Tasso di crescita	% inibizione del tasso di crescita
Controllo neg.	3499556	-	1.9497	-
dil. 16	4075956	0	2.0033	0
dil. 8	3822756	0	1.9820	0
dil. 4	3664422	0	1.9670	0
dil. 2	3154022	9.9	1.9157	1.7
TQ	2403489	31.4	1.8257	6.4

7.2 Saggio di Tossicità Acuta su *Daphnia magna*

La procedura utilizzata per questo saggio è descritta nel paragrafo 6.3.

CAMPIONE: Campionamento acqua a Valle
CODICE CHEMSERVICE: CDS-23-625

pH delle soluzioni:

Diluizione del campione	Valori Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	7.78 – 7.90
TQ	7.77 – 8.20

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

Concentrazione di ossigeno:

Diluizione del campione	Valori (mg/L) Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	6.74 – 6.32
TQ	6.44 – 6.45

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

Criteri di validità del test:

- *Nel controllo l'immobilizzazione delle dafnie non deve superare il 10%
- *Il pH non deve variare più di 1.5 unità al termine del test
- *La concentrazione dell'ossigeno disciolto deve essere ≥ 3 mg/l alla fine del saggio

Lo studio risulta valido in quanto tutti i criteri di validità sono stati rispettati.

Risultati biologici: Immobilizzazione

Tempo di esposizione (h)	Concentrazione del campione (mg/L)	Organismi esposti	Organismi immobilizzati	Percentuale di immobilizzazione (%)
48	0.0 (controllo neg.)	20	0	0
	TQ	20	0	0

CAMPIONE: Campionamento acqua a Monte
CODICE CHEMSERVICE: CDS-23-626

pH delle soluzioni:

Diluizione del campione	Valori Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	7.78 – 7.90
TQ	8.09 – 7.81

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

Concentrazione di ossigeno disciolto:

Diluizione del campione	Valori (mg/L) Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	6.74 – 6.32
TQ	7.02 – 6.49

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

Criteri di validità del test:

- *Nel controllo l'immobilizzazione delle dafnie non deve superare il 10%
- *Il pH non deve variare più di 1.5 unità al termine del test
- *La concentrazione dell'ossigeno disciolto deve essere ≥ 3 mg/l alla fine del saggio

Lo studio risulta valido in quanto tutti i criteri di validità sono stati rispettati.

Risultati biologici: Immobilizzazione

Tempo di esposizione (h)	Concentrazione del campione (mg/L)	Organismi esposti	Organismi immobilizzati	Percentuale di immobilizzazione (%)
48	0.0 (controllo neg.)	20	0	0
	TQ	20	0	0

7.3 Saggio di Tossicità Acuta su uova di pesce (*Danio rerio*)

Il test di tossicità acuta su uova di *Danio rerio* è stato condotto seguendo il metodo descritto nella linea guida OECD 236, 2013 utilizzando uova di pesce fecondate con una divisione cellulare al massimo di 16 cellule. Le uova vengono ottenute da pesci riproduttori mantenuti nell'allevamento sito nei laboratori di Chemservice.

Per la preparazione delle soluzioni diluite a cui è stato effettuato il saggio è stata utilizzata acqua di diluizione standard preparata come riportato nella ISO 7346-1 e 7346-2.

Reagenti

CaCl₂ 2H₂O
MgSO₄ 7H₂O
NaHCO₃
KCl

Concentrazione in acqua

294.0 mg/L
123.3 mg/L
63.0 mg/L
5.5 mg/L

La percentuale di fertilizzazione delle uova utilizzate per il test è stata l'91% del totale delle uova prodotte.

Sono stati preparati 20 pozzetti di una piastra multi-pozzetto da 24 per ogni diluizione effettuata (dil. 16, 8, 4, e 2), per il campione tal quale (TQ), per la sola acqua ricostituita (controllo negativo), e per la soluzione di riferimento di 3,4-dichloroaniline a concentrazione 3,7 mg/L.

Invece, 4 pozzetti per piastra sono utilizzati come controllo della piastra, esponendo gli embrioni alla stessa acqua di diluizione del controllo e servono a valutare lo stato della piastra. Se più di un embrione dovesse morire nei controlli piastra, essa viene esclusa dal calcolo dei risultati.

Le piastre multi-pozzetto così preparate vengono incubate in condizioni controllate all'interno di una camera climatica.

All'inizio e alla fine del test sono stati registrati i parametri di pH e ossigeno per ogni diluizione effettuata.

Giornalmente, è stata registrata la mortalità delle uova secondo i parametri definiti dalla linea guida (OECD 236, 2013).

I dati registrati alla fine del test (96 ore) sono stati utilizzati per determinare la LC₅₀.

Durata del test: 96 ore

Temperature dello studio: tra 25 e 27°C per tutte le soluzioni del saggio
(conforme al range raccomandato dalla OECD 236, 2013)

CAMPIONE: Campionamento acqua a Valle

CODICE CHEMSERVICE: CDS-23-625

pH della campione:

Diluizione del campione	Valori Inizio test – Fine test
Controllo neg.	7.99 – 7.70
Controllo pos.	8.18 – 8.07
dil. 16	8.02 – 7.79
dil. 8	8.05 – 7.84
dil. 4	8.09 – 8.12
dil. 2	8.15 – 8.18
TQ	8.29 – 8.30

Concentrazione di ossigeno:

Diluizione del campione	Valori (%) Inizio test – Fine test
Controllo neg.	92.9 – 90.4
Controllo pos.	92.7 – 91.9
dil. 16	93.1 – 88.8
dil. 8	90.7 – 89.2
dil. 4	97.0 – 92.5
dil. 2	91.6 – 90.0
TQ	99.2 – 93.7

conforme al range raccomandato > 80% (OECD 236, 2013)

Risultati biologici:

Mortalità

Tempo di esposizione (h)	Diluizione del campione	Uova esposte	Uova schiuse	Embrioni vivi	Embrioni morti	Percentuale di mortalità (%)
96	Controllo	24	24	24	0	0
	Controllo	20	0	0	20	100
	16	20	19	19	1	5
	8	20	17	17	3	15
	4	20	18	18	2	10
	2	20	18	20	0	0
	TQ	20	17	18	2	10

Criteria di validità

*Nel controllo negativo la sopravvivenza degli embrioni deve essere almeno il 90% nelle 96 ore.

*Nel controllo positivo la mortalità degli embrioni deve essere > 30% alla fine del test.

*Il tasso di fertilizzazione complessivo di tutte le uova raccolte deve essere ≥ 70% nel lotto testato

*Il tasso di schiusa nel controllo negativo deve essere ≥ 80% alla fine del test.

Lo studio risulta valido in quanto tutti i criteri di validità sono stati rispettati.

CAMPIONE: Campionamento acqua a Monte
CODICE CHEMSERVICE: CDS-23-626

pH della campione:

Diluizione del campione	Valori Inizio test – Fine test
Controllo neg.	7.99 – 7.70
Controllo pos.	8.18 – 8.07
dil. 16	8.02 – 7.85
dil. 8	8.04 – 8.00
dil. 4	8.07 – 8.08
dil. 2	8.14 – 8.13
TQ	8.14 – 8.19

Concentrazione di ossigeno:

Diluizione del campione	Valori (%) Inizio test – Fine test
Controllo neg.	92.9 – 90.4
Controllo pos.	92.7 – 91.9
dil. 16	97.8 – 95.1
dil. 8	95.8 – 95.7
dil. 4	99.7 – 94.4
dil. 2	92.6 – 91.3
TQ	94.4 – 92.2

conforme al range raccomandato > 80% (OECD 236, 2013)

Risultati biologici:

Mortalità

Tempo di esposizione (h)	Diluizione del campione	Uova esposte	Uova schiuse	Embrioni vivi	Embrioni morti	Percentuale di mortalità (%)
96	Controllo neg.	24	24	24	0	0
	Controllo pos.	20	0	0	20	100
	16	20	18	18	2	10
	8	20	17	18	2	10
	4	20	17	18	2	10
	2	20	17	17	3	15
	TQ	20	18	19	1	5

Criteri di validità

*Nel controllo negativo la sopravvivenza degli embrioni deve essere almeno il 90% nelle 96 ore.

*Nel controllo positivo la mortalità degli embrioni deve essere > 30% alla fine del test.

*Il tasso di fertilizzazione complessivo di tutte le uova raccolte deve essere \geq 70% nel lotto testato

*Il tasso di schiusa nel controllo negativo deve essere \geq 80% alla fine del test.

Lo studio risulta valido in quanto tutti i criteri di validità sono stati rispettati.

7.4 Saggio di Genotossicità – Test Di Ames

La procedura utilizzata per questo saggio è descritta nel paragrafo 6.3.

7.4.1 Test preliminari

Il test di precipitazione preliminare è stato condotto miscelando 100 μ L di ciascun campione con 500 μ L di tampone fosfato o di S9mix rispettivamente per la prova condotta senza e con attivazione metabolica.

In assenza di precipitazione o altra alterazione visibile ad occhio nudo, a ciascuna soluzione sono stati addizionati 2 mL di top agar e si è piastrata la soluzione risultante. Avvenuta la solidificazione del top agar, le piastre sono state poste in incubatore per 2-4 ore e successivamente le piastre sono state osservate per la presenza di depositi o alterazioni visibili a occhio nudo.

Tabella 11 Comportamento dei campioni nelle condizioni test

Campione	Concentrazione (% v/v)	Apparenza della miscela	Apparenza della piastra post incubazione
CDS-23-625 Acque a valle	100	Soluzione limpida, trasparente, assenza di precipitato	La piastra non presenta alterazioni o depositi visibili.
CDS-23-626 Acque a monte	100	Soluzione limpida e trasparente, assenza di precipitato	La piastra non presenta alterazioni o depositi visibili.

Non sono state registrate alterazioni o precipitati visibili ad occhio nudo testando ciascun campione tal quale (100%), sia in presenza che in assenza di attivatore metabolico.

7.4.2 Validità dei controlli

Il numero di colonie revertanti spontanee nei controlli negativi (acqua ultrapura) e nei controlli positivi (2-nitrofluorene, sodium azide e 2-aminoanthracene), con e senza attivazione metabolica (S9), è in linea con il range storico dei controlli. Inoltre, i controlli positivi hanno indotto un incremento del numero di colonie revertanti tale per cui il Mutation rate risultante è maggiore di 3.

PRE-INCUBATION					
Negative Control			Positive Control		
S9-					
Parameter	TA98	TA100	Parameter	TA98	TA100
Mean	13,8	72,7	Mean	141,1	395,2
SD	5,7	6,3	SD	30	115,1
Min	3	62	Min	88	253
Max	25	86	Max	202	547
S9+					
Parameter	TA98	TA100	Parameter	TA98	TA100
Mean	17,3	103,9	Mean	232,4	605
SD	4,3	14,9	SD	76,1	132,4
Min	10	81	Min	120	400
Max	27	136	Max	372	800

Il batch di S9 utilizzato ha mostrato ad un'appropriate attività biologica, come da certificato.

Non si sono verificate contaminazioni nelle repliche sperimentali.

Tutti i criteri di validità risultano quindi rispettati ed il test è considerato valido.

CAMPIONE: Acqua a valle dell'impianto
CODICE CHEMSERVICE: CDS-23-625

Nelle Tabelle 12 e 13 sono riportati i risultati ottenuti rispettivamente sui ceppi TA98 e TA100, in assenza (S9-) e presenza (S9+) di attivazione metabolica.

Tabella 12 Risultati del test sull'acqua a VALLE dell'impianto con S. typhimurium TA98

TA98									
	Test Concentration (%)	REPLICATE				ELABORATION		ASSESSMENT	
		1	2	3	4	MEAN	SD	MUTATION RATE	ALERT
S9-	Negative Control	7	10	18		11,7	5,7	1,00	No
	100	12	13	11		12,0	1,0	1,03	No
	50	7	14	13		11,3	3,8	0,97	No
	16	11	12	11		11,3	0,6	0,97	No
	5	12	13	9		11,3	2,1	0,97	No
	1,6	10	13	12		11,7	1,5	1,00	No
	Positive Control (PC)	125	134	178		145,7	28,4	12,49	Yes
S9+	EXPERIMENTAL GROUP	1	2	3	4	MEAN	SD	MUTATION RATE	ALERT
	Negative Control	16	10	13		13,0	3,0	1,00	No
	100	16	8	15		13,0	4,4	1,00	No
	50	16	18	10		14,7	4,2	1,13	No
	16	12	13	13		12,7	0,6	0,97	No
	5	15	11	12		12,7	2,1	0,97	No
	1,6	15	10	14		13,0	2,6	1,00	No
Positive Control (PC)	88	80	130		99,3	26,9	7,64	Yes	

Tabella 13 Risultati del test sull'acqua a VALLE dell'impianto con S. typhimurium TA100

TA100									
	Test Concentration (%)	REPLICATE				ELABORATION		ASSESSMENT	
		1	2	3	4	MEAN	SD	MUTATION RATE	ALERT
S9-	Negative Control	90	82	80		84,0	5,3	1,00	No
	100	85	88	83		85,3	2,5	1,02	No
	50	82	98	86		88,7	8,3	1,06	No
	16	84	82	88		84,7	3,1	1,01	No
	5	85	81	86		84,0	2,6	1,00	No
	1,6	88	84	81		84,3	3,5	1,00	No
	Positive Control (PC)	440	421	430		430,3	9,5	5,12	Yes
S9+	EXPERIMENTAL GROUP	1	2	3	4	MEAN	SD	MUTATION RATE	ALERT
	Negative Control	83	85	81		83,0	2,0	1,00	No
	100	76	84	80		80,0	4,0	0,96	No
	50	78	84	84		82,0	3,5	0,99	No
	16	84	85	81		83,3	2,1	1,00	No
	5	79	82	83		81,3	2,1	0,98	No
	1,6	80	86	84		83,3	3,1	1,00	No
Positive Control (PC)	575	760	605		646,7	99,3	7,79	Yes	

Dallo studio condotto sul campione di acque a VALLE dell'impianto non sono emerse evidenze di genotossicità nelle condizioni sperimentali adottate.

CAMPIONE: Acqua a monte dell'impianto
CODICE CHEMSERVICE: CDS-23-626

Nelle Tabelle 14 e 15 sono riportati i risultati ottenuti rispettivamente sui ceppi TA98 e TA100, in assenza (S9-) e presenza (S9+) di attivazione metabolica.

Tabella 14 Risultati del test sull'acqua a MONTE dell'impianto con *S. typhimurium* TA98

TA98									
	Test Concentration (%)	REPLICATE				ELABORATION		ASSESSMENT	
		1	2	3	4	MEAN	SD	MUTATION RATE	ALERT
S9-	Negative Control	7	10	18		11,7	5,7	1,00	No
	100	8	16	11		11,7	4,0	1,00	No
	50	13	13	17		14,3	2,3	1,23	No
	16	11	13	10		11,3	1,5	0,97	No
	5	12	10	12		11,3	1,2	0,97	No
	1,6	12	11	12		11,7	0,6	1,00	No
	Positive Control (PC)	125	134	178		145,7	28,4	12,49	Yes
S9+	EXPERIMENTAL GROUP	REPLICATE				ELABORATION		ASSESSMENT	
		1	2	3	4	MEAN	SD	MUTATION RATE	ALERT
	Negative Control	16	10	13		13,0	3,0	1,00	No
	100	16	17	12		15,0	2,6	1,15	No
	50	19	15	16		16,7	2,1	1,28	No
	16	15	13	11		13,0	2,0	1,00	No
	5	14	11	13		12,7	1,5	0,97	No
1,6	13	12	13		12,7	0,6	0,97	No	
Positive Control (PC)	88	80	130		99,3	26,9	7,64	Yes	

Tabella 15 Risultati del test sull'acqua a MONTE dell'impianto con *S. typhimurium* TA100

TA100									
	Test Concentration (%)	REPLICATE				ELABORATION		ASSESSMENT	
		1	2	3	4	MEAN	SD	MUTATION RATE	ALERT
S9-	Negative Control	90	82	80		84,0	5,3	1,00	No
	100	83	106	71		86,7	17,8	1,03	No
	50	90	97	116		101,0	13,5	1,20	No
	16	90	80	84		84,7	5,0	1,01	No
	5	92	84	80		85,3	6,1	1,02	No
	1,6	82	90	83		85,0	4,4	1,01	No
	Positive Control (PC)	440	421	430		430,3	9,5	5,12	Yes
S9+	EXPERIMENTAL GROUP	REPLICATE				ELABORATION		ASSESSMENT	
		1	2	3	4	MEAN	SD	MUTATION RATE	ALERT
	Negative Control	83	85	81		83,0	2,0	1,00	No
	100	81	72	93		82,0	10,5	0,99	No
	50	79	75	74		76,0	2,6	0,92	No
	16	80	83	83		82,0	1,7	0,99	No
	5	85	81	80		82,0	2,6	0,99	No
1,6	84	86	84		84,7	1,2	1,02	No	
Positive Control (PC)	575	760	605		646,7	99,3	7,79	Yes	

Dallo studio condotto sul campione di acque a MONTE dell'impianto non sono emerse evidenze di genotossicità nelle condizioni sperimentali adottate.

8 RISULTATI E CONCLUSIONI

I dati ottenuti nei saggi eco-genotossicologici eseguiti sui campioni di acqua del fiume Po e del suolo nei pressi della Centrale termoelettrica "EP Centrale Ostiglia S.p.A." di Ostiglia sono stati elaborati ed analizzati al fine di determinare la presenza di effetti tossici e/o mutageni.

I risultati ottenuti sono qui riportati:

Tabella 16 Riepilogo risultati test eco-genotossicologici

Metodo	U.M.	CDS-23-623 / E-CDS-23-623	CDS-23-624 / E-CDS-23-624	CDS-23-625	CDS-23-626	Inizio – Fine prova
Saggio di tossicità su crostaceo <i>Daphnia magna</i>	NOEC	TQ	TQ	TQ	TQ	07/06/2023 – 09/06/2023
Saggio di tossicità su alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	NOEC	n.a.	n.a.	Dil 1:2	Dil 1:2	05/06/2023 – 08/06/2023
	E _r C ₅₀	n.a.	n.a.	>TQ	>TQ	
Saggio di tossicità su uova di pesce <i>Danio rerio</i>	LC ₅₀	n.a.	n.a.	>TQ	>TQ	01/06/2023 – 05/06/2023
Saggio di tossicità su verme <i>Eisenia fetida</i>	LC ₅₀	>TQ	>TQ	n.a.	n.a.	06/07/2023 – 20/07/2023
Test di Ames	MR	<2 Non Mutageno	<2 Non Mutageno	<2 Non Mutageno	<2 Non Mutageno	19/06/2023 – 23/06/2023

U.M. = unità di misura
 TQ = campione tal quale
 n.a. = non applicabile
 NOEC = concentrazione di non effetto
 EC₅₀ = la concentrazione calcolata dell'elemento di prova che si traduce in un tasso di effetto del 50%.
 LC₅₀ = la concentrazione calcolata dell'elemento di prova che si traduce in un tasso di mortalità del 50%.
 MR = tasso di mutagenesi batterica

In base alla batteria di test effettuata sui campioni di acque prelevati dal fiume Po, sia a monte che a valle degli scarichi idrici della Centrale termoelettrica "EP Centrale Ostiglia S.p.A." di Ostiglia (MN), e di suoli, campionati nei pressi delle zone interessate dalle massime ricadute medie annue di particolato secondario nella configurazione di progetto, non si sono riscontrati effetti ecotossicologici acuti o effetti mutageni.

Firma del tecnico



Stefano Ceriati

21/12/2023

Data