

RELAZIONE TECNICA

Batteria di saggi di ecotossicità e genotossicità per la determinazione della qualità delle acque marine, dei sedimenti e dei suoli nei pressi della centrale di Ravenna

Committente

Spett.le
ERM ITALIA SPA
VIA S. GREGORIO, 38
20124 MILANO (MI)

Laboratorio Incaricato

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

Laboratorio Incaricato (*Acartia tonsa* e *Corophium orientale*)

Centro Interuniversitario di
Biologia Marina ed Ecologia Applicata
C.I.M.B. "G. Bacci"
Via N. Sauro 4,
57128 Livorno (Li)
Italia

SOMMARIO

SOMMARIO.....	2
OBIETTIVO DEL PROGETTO.....	3
IDENTIFICAZIONE DEI CAMPIONI.....	4
PUNTI DI CAMPIONAMENTO.....	6
LINEE GUIDA E METODI.....	8
DEFINIZIONI.....	9
PREPARAZIONE DELL'ELUTRIATO.....	9
SAGGI ECOTOSSICOLOGICI SULLE ACQUE MARINE.....	11
Saggio di inibizione dell'emissione luminosa su <i>Vibrio fischeri</i>	11
Principio del metodo.....	11
Composizione del controllo.....	12
Risultati.....	12
Saggio di tossicità acuta su <i>Acartia tonsa</i>	16
Principio del metodo.....	16
Risultati.....	17
Saggio di inibizione della crescita di alghe marine.....	18
Principio del metodo.....	18
Composizione del mezzo acquoso.....	19
Risultati.....	20
Conclusioni.....	21
SAGGI ECOTOSSICOLOGICI SUI SEDIMENTI.....	22
Saggio di tossicità acuta su <i>Corophium orientale</i>	22
Principio del metodo.....	22
Risultati.....	23
Conclusioni.....	24
SAGGI ECOTOSSICOLOGICI SUL SUOLO ED ELUTRIATO.....	25
Saggio di tossicità acuta su <i>Daphnia magna</i>	25
Principio del metodo.....	25
Composizione del mezzo acquoso.....	25
Risultati.....	26
Saggio di tossicità acuta su <i>Eisenia fetida</i>	28
Principio del metodo.....	28
Composizione del suolo artificiale.....	28
Risultati.....	29
Conclusioni.....	30
SAGGIO DI GENOTOSSICITA'.....	31
Test di Ames.....	31
Principio del metodo.....	31
Procedura.....	33
Risultati.....	34
Conclusioni.....	35

OBIETTIVO DEL PROGETTO

L'obiettivo del progetto è stato la caratterizzazione ecotossicologica delle acque marine e da lisciviazione (elutriato), dei sedimenti e nei suoli presenti nelle immediate vicinanze della centrale di Ravenna.

Inoltre, per le acque marine e da lisciviazione (elutriato) si è indagato anche il potenziale mutagenico.

Per effettuare l'indagine sono stati prelevati campioni di acqua marina e sedimenti in cinque punti nei canali Candiano e Magni di Ravenna nelle vicinanze degli scarichi idrici dell'area industriale e quattro campioni di suolo in un'area nelle vicinanze della centrale.

La caratterizzazione ecotossicologica dei campioni di acqua marina è stata valutata attraverso:

- Saggio di inibizione di bioluminescenza del batterio *Vibrio fischeri*,
- Saggio di inibizione della crescita dell'alga *Phaeodactylum tricornutum*,
- Saggio di tossicità acuta sul crostraceo copepode *Acartia tonsa*,

La caratterizzazione ecotossicologica dei campioni di sedimento è stata valutata attraverso:

- Saggio di tossicità acuta sul crostaceo anfipode *Corophium orientale*.

La caratterizzazione ecotossicologica dei campioni di suolo è stata valutata attraverso:

- Saggio di tossicità sul verme *Eisenia fetida* (per la valutazione degli effetti tossici acuti sul comparto terrestre)
- Saggio di tossicità acuta sul crostaceo cladocero *Daphnia magna* Strauss (per la valutazione degli effetti tossici acuti sul comparto acqua dovuto alla lisciviazione del suolo (elutriato))

Il potenziale mutagenico dei campioni di acque marine e da lisciviazione del suolo (elutriato) è stato valutato mediante

- Test di Ames su due ceppi cellulari di *Salmonella typhimurium* (TA98-TA100) in presenza e assenza di una miscela di enzimi attivatori metabolici (S9).

IDENTIFICAZIONE DEI CAMPIONI

Nelle Tabelle 1, 2 e 3 viene descritto come sono stati identificati i campioni arrivati in laboratorio.

Tabella 1: Identificazione campioni di acqua marina

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

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

Tabella 2: Identificazione campioni di sedimento

Nome campione	Sedimento A_1	Sedimento A_2	Sedimento A_3	Sedimento A_4	Sedimento A_5
Codice campione CIBM	1765-22	1766-22	1767-22	1768-22	1769-22
Data di campionamento	17/05/2022	17/05/2022	17/05/2022	17/05/2022	17/05/2022
Data di ricevimento in laboratorio	19/05/2022	19/05/2022	19/05/2022	19/05/2022	19/05/2022
Quantità	~ 600 g				
Contenitore	Bottiglia in HDPE				

Tabella 3: Identificazione campioni di suolo

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

PUNTI DI CAMPIONAMENTO

Di seguito vengono riportati i punti di campionamento delle acque marine e sedimenti (figura 1) e dei suoli (figura 2).



Figura 1: Punti di campionamento acqua marina e sedimento nei canali Candiano (a destra) e Magni (a sinistra) di Ravenna



Figura 2: Punti di campionamento suolo

LINEE GUIDA E METODI

- OECD No. 202, 2004 - "*Daphnia sp.*, Acute Immobilization Test"
- OECD No. 207, 1984: Earthworm, Acute Toxicity Tests
- UNI EN ISO 5667-16 Qualità dell'acqua - Campionamento - Parte 16: Guida al saggio biologico di campioni
- UNI EN 12457-2:2004: Characterization of waste; Leaching – Compliance test for leaching of granular waste materials and sludges.
- UNI EN ISO 11348-3 Qualità dell'acqua - Determinazione dell'effetto inibitorio di campioni acquosi sull'emissione di luce di *Vibrio fischeri* (prova su batteri luminescenti) - Parte 3: Metodo con batteri liofilizzati
- UNI EN ISO 10253 Qualità dell'acqua - Saggio di inibizione della crescita delle alghe marine *Skeletonema costatum* e *Phaeodactylum tricornutum*
- ISO 16712 Water quality — Determination of acute toxicity of marine or estuarine sediment to amphipods
- UNICHIM Metodo n. 2365 QUALITA' DELL'ACQUA – Determinazione dell'inibizione della mobilità di nauplii di *Acartia tonsa* Dana (Crustacea: Copepoda) dopo 24 h e 48 h di esposizione
- OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 4, No. 471, "Bacterial Reverse Mutation Test", adopted 21st July, 1997, Corrected 26th June 2020

DEFINIZIONI

Ecotossicità

- TQ: campione tal quale (acqua/elutriato o suolo senza ricostituzioni o diluizioni).
- Controllo negativo: gruppo di organismi non esposti al campione da testare, ma mantenuti in un terreno standard (acqua o suolo) che ne garantisca la buona salute.
- LOEC: la più bassa concentrazione saggiata alla quale il campione dà un effetto avverso significativo sugli organismi esposti durante il test.
- NOEC: la più alta concentrazione saggiata alla quale il campione non dà effetti avversi statisticamente significativi sugli organismi esposti durante il test.
- LC_x/EC_x: la concentrazione calcolata di sostanza test che causa la morte/un effetto avverso sul x% degli organismi esposti.
- WHC: La WHC (Maximum Water Holding Capacity) è la capacità di ritenzione di acqua del terreno.

Genotossicità

- Controllo positivo: gruppo trattato con una sostanza di riferimento specifico con effetti genotossici per dimostrare l'efficacia del test.
- Controllo non trattato: gruppo non trattato (né con il campione da testare, né con la sostanza di riferimento, né con il solo veicolo).

PREPARAZIONE DELL'ELUTRIATO

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

L'identificazione dei campioni preparati è descritta nella tabella 3.

Il contenuto di umidità presente all'interno del suolo è stato determinato tramite essiccamento di un'aliquota di campione per 24 ore a 105°C.

Nel presente caso gli elutriati sono stati preparati trasferendo un'aliquota di suolo equivalente a 0.090 kg di campione secco setacciato a <4mm di diametro all'interno di una bottiglia di vetro insieme ad acqua deionizzata corrispondente ad un rapporto L/S pari a 10 L/kg. I pesi ed i volumi utilizzati per ogni campione sono descritti in tabella 4.

Le bottiglie sono quindi poste in agitazione all'interno di un miscelatore a rovesciamento settato a 10 giri/minuto per 24 ore.

Al termine dell'agitazione si è lasciato sedimentare le sospensioni per 15 minuti prima di separare la fase liquida da quella solida.

Tabella 4: identificazione campioni di elutriati da suolo

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

I campioni di elutriato sono stati congelati a -20°C dopo la preparazione. Per lo scongelamento si è utilizzata la procedura descritta nella linea guida UNI EN ISO 5667-16.

Tabella 5: preparazione elutriati

Identificativo del campione	Suolo umido utilizzato (kg)	Volume di acqua aggiunto (L)
E_2201416-001	0.0940	0.896
E_2201416-002	0.1032	0.886
E_2201416-003	0.0959	0.894
E_2201416-004	0.0996	0.890

Risultando impossibile effettuare la separazione liquido/solido applicando la normale procedura descritta dalla UNI EN 12457-2 : 2004 in meno di un'ora, è stato applicato il metodo riportato nell'appendice E della norma.

Il liquido surnatante risultato dalla sedimentazione è stato posto in centrifuga per 30 minuti a 2000 g. Successivamente, il liquido surnatante ottenuto dalla centrifugazione è stato filtrato con membrana filtrante di diametro 142 mm e porosità 0.45 µm.

La filtrazione è stata effettuata senza pressione per 5 minuti; quindi, è stata applicata una pressione di 1 bar. Il tempo di filtrazione è stato di circa 25 minuti.

La soluzione risultante appariva limpida e presentava una colorazione marrone.

Per il saggio di genotossicità, il liquido surnatante derivante dalla centrifugazione delle acque marine e degli elutriati dei suoli è stato filtrato con membrana filtrante a porosità di 0.22 µm all'interno della cappa biologica a flusso laminare (classe II) per garantire la sterilità del campione intesa come assenza di batteri che interferirebbero con il normale svolgimento del test.

SAGGI ECOTOSSICOLOGICI SULLE ACQUE MARINE

Sui campioni di acqua marina sono stati condotti studi di ecotossicità acuta su:

- Batterio bioluminescente *Vibrio fischeri*
- Crostaceo copepode *Acartia tonsa*
- Alga marina *Phaeodactylum tricornutum*

Sui campioni di sedimento sono stati condotti studi di ecotossicità acuta su:

- Crostaceo anfipode *Corophium orientale*

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

Principio del metodo

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

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

In questo studio è stato utilizzato il sistema automatizzato Microtox Analyzer 500 (Modern Water) con batteri congelati di *Vibrio fischeri* (conservati a -20°C).

Microtox® M500 è un fotometro a temperatura controllata dotato di pozzetti termostatati a 5°C per la ricostituzione dei batteri e a 15°C per l'analisi dei controlli negativi e dei campioni.

Gli organismi utilizzati per questi saggi ecotossicologici sono stati acquistati da: Ecotox LDS (Batch: BL10970422).

Il test viene svolto esponendo un'aliquota di batteri a diluizioni successive del campione.

All'inizio di ogni saggio, la sospensione contenente i batteri deve essere riattivata utilizzando una specifica soluzione ricostituente e lasciandola a temperatura di 5°C per 40 minuti.

Al termine dei 40 minuti la sospensione ricostituita di batteri viene diluita all'interno della soluzione di controllo (acqua marina ricostituita) con una diluizione 1:10 a 15°C per 15 minuti.

La sospensione di batteri diluita viene quindi aliquotata in tanti pozzetti quante sono le soluzioni da testare (più il controllo) trasferendo 100 µl di sospensione.

Dopo aver calibrato il fotometro con l'emissione luminosa dell'aliquota del controllo, utilizzandolo come bianco iniziale, e dopo aver letto le emissioni di ogni aliquota, i batteri vengono esposti al campione. L'inibizione della bioluminescenza viene analizzata effettuando misure di emissione luminosa dopo l'esposizione dei batteri per 5, 15 e 30 minuti al campione da analizzare, confrontandola con quella dei batteri esposti al controllo negativo.

Composizione del controllo

Per la preparazione del controllo negativo è stata utilizzata acqua marina ricostituita preparata in accordo alla linea guida UNI EN ISO 11348-3 (Annex D).

Per il controllo viene utilizzata acqua marina e non il diluente di sodio cloruro in quanto la bioluminescenza dei batteri di *Vibrio fischeri* è maggiore nelle acque salate rispetto che nelle acque dolci. Utilizzando il normale diluente (20 g/l di sodio cloruro) un possibile effetto tossico potrebbe risultare mascherato.

<u>Acqua marina artificiale (ABW)</u>	<u>Concentrazione finale</u>
--	-------------------------------------

Sali	(g/l)
NaCl	22,0
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	9,7
Na ₂ SO ₄ (anidro)	3,7
CaCl ₂ (anidro)	1,0
KCl	0,65
NaHCO ₃	0,20
H ₃ BO ₃	0,023
Conducibilità (μS/cm) (20 °C)	47,000 ± 1,000
Salinità (20 °C)	31 ± 1 20
pH	7,5 ± 0,2

Risultati

Per poter svolgere il test, il campione deve avere un pH compreso tra 6,0 e 8,5. Qualora non lo sia, bisogna aggiustarlo con NaOH o HCl; in tale caso bisogna effettuare il test sul campione corretto e sul campione iniziale.

L'ossigeno disciolto nel campione deve essere superiore a 3 mg/L. Qualora sia inferiore il campione va aerato fino a raggiungere almeno questa concentrazione.

Tabella 6: valori di pH del campione TQ all'inizio del test

Codice campione	Valori pH
Controllo negativo	7,62
2201406-001	7,48
2201406-002	7,15
2201406-003	7,31
2201406-004	7,43
2201406-005	7,57

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

Tabella 7: valori di salinità del campione TQ all'inizio del test

Codice campione	Valori salinità (‰)
Controllo negativo	31
2201406-001	38
2201406-002	37
2201406-003	36
2201406-004	37
2201406-005	36

Tabella 8: valori di Ossigeno disciolto del campione TQ all'inizio del test

Codice campione	Valori ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo negativo	7,38
2201416-001	6,51
2201416-002	6,54
2201416-003	6,82
2201416-004	6,19
2201406-005	6,67

(conforme al range raccomandato ≥ 3 mg/L UNI EN ISO 11348-3)

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

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

Campione 2201406-001

Tabella 9: letture dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione

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

Campione 2201406-002
Tabella 10 letture dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione

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

Campione 2201406-003
Tabella 11 letture dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione

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

Campione 2201406-004
Tabella 12 letture dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione

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

Campione 2201406-005

Tabella 13 letture dopo 5, 15 e 30 minuti di esposizione

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

Criterio di validità del test:

Il test è considerato valido perchè:

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

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

Tabella 14 risultati dell'endpoint: Inibizione della bioluminescenza

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

Saggio di tossicità acuta su *Acartia tonsa*

Principio del metodo

Il saggio di tossicità acuta con *Acartia tonsa* a 24 e 48 ore è stato eseguito secondo quanto descritto nella UNICHIM 2365 (2012).

Per l'allestimento del saggio sono state utilizzate uova di *A. tonsa* raccolte dal ceppo di laboratorio entro le 72 ore dall'allestimento del test.

Il tossico di riferimento utilizzato è $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Il valore di EC_{50} con il tossico di riferimento è risultato pari a 0,030 (0,020-0,050) mg Ni^{2+}/L a 24h di esposizione, mentre a 48h 0,029 (0,013-0,041) mg Ni^{2+}/L .

Nelle tabelle seguenti si riportano i valori di Salinità, pH e ossigeno disciolto misurati sul campione tal quale prima dell'inizio dei test.

Tabella 15: valori di pH dei campioni TQ all'inizio del test

Codice campione	Valori pH Inizio test
Controllo negativo	8,07
2201406-001	7,04
2201406-002	6,51
2201406-003	6,86
2201406-004	6,98
2201406-005	6,97

Tabella 16: valori di salinità dei campioni TQ all'inizio del test

Codice campione	Valori salinità (‰)
Controllo negativo	30
2201406-001	39
2201406-002	38
2201406-003	38
2201406-004	38
2201406-005	36

Tabella 17: valori di Ossigeno disciolto dei campioni TQ all'inizio del test

Codice campione	Valori ossigeno disciolto (mg/L)
Controllo negativo	6,52
2201406-001	6,41
2201406-002	6,72
2201406-003	7,01
2201406-004	6,54
2201406-005	6,39

Risultati

Nelle tabelle seguenti sono mostrati i risultati relativi al saggio di tossicità acuta con *A. tonsa*. Il test è risultato valido secondo i limiti di accettabilità del test riportati nella nota in calce alla tabella.

Tabella 18 test con copepodi (*A. tonsa*) a 24 h eseguito su campioni diluiti (max conc. testata 85%)

Campione	Massima concentrazione saggiata (%)	Media % naupli mobili (± D.S.)	Media % naupli immobili (± D.S.)
Controllo metodologico	-	100,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2201406-001	85	93,33 ± 0,58	6,67 ± 0,58
2201406-002	85	96,67 ± 0,58	3,33 ± 0,58
2201406-003	85	93,33 ± 0,58	6,67 ± 0,58
2201406-004	85	93,33 ± 0,58	6,67 ± 0,58
2201406-005	85	96,67 ± 0,58	3,33 ± 0,58

Tabella 19 test con copepodi (*A. tonsa*) a 48 h eseguito su campioni diluiti (max conc. testata 85%)

Campione	Massima concentrazione saggiata (%)	Media % naupli mobili (± D.S.)	Media % naupli immobili (± D.S.)
Controllo metodologico	-	93,33 ± 0,58	6,67 ± 0,58
2201406-001	85	93,33 ± 0,58	6,67 ± 0,58
2201406-002	85	90,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00
2201406-003	85	93,33 ± 0,58	6,67 ± 0,58
2201406-004	85	90,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00
2201406-005	85	96,67 ± 0,58	3,33 ± 0,58

Criterio di validità del test:

Il test è considerato valido perché:

- la percentuale di immobilizzazione dei naupli nel controllo metodologico è stata < 20%.
- l'EC₅₀ del controllo positivo è rientrato tra i valori di: 0,37 (±0,18) mg Ni²⁺/L a 24h e 0,24 (±0,12) mg Ni²⁺/L a 48h.

Non si osservano effetti di tossicità acuta, in termini di immobilizzazione dei naupli, rispetto al controllo in nessuno dei campioni testati.

La massima concentrazione saggiata è stata 85% a causa dei limiti di salinità previsti per una corretta schiusa delle uova (30%±2).

Tutti i campioni testati non hanno evidenziato percentuali di immobilizzazione dei naupli significativamente maggiori rispetto al controllo, sia a 24 che a 48 ore di esposizione.

Dati i risultati ottenuti non è stato possibile calcolare i valori di EC₂₀ e/o di EC₅₀ e pertanto la tossicità risulta assente.

Saggio di inibizione della crescita di alghe marine

Principio del metodo

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

In preparazione al test, il campione tal quale (TQ) è stato filtrato su lana di vetro per rimuovere il sedimento grossolano presente e successivamente ricostituito con la stessa miscela di sali del controllo negativo.

Sono state allestite tre repliche per ogni campione (TQ) e sei repliche contenenti solo acqua marina sintetica (controllo negativo) e, successivamente, inoculate con un volume noto di una coltura in crescita esponenziale in modo da avere una concentrazione iniziale pari a 10000 cellule/mL.

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 lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 670 nm. L'inibizione della crescita è stata determinata rispetto alla coltura di controllo.

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

Composizione del mezzo acquoso

Per il controllo negativo è stata preparata acqua marina artificiale SSW cui sono stati aggiunti nutrienti (tabella 33) seguendo le direttive della UNI EN ISO 10253:2016. Di seguito ne è riportata la composizione:

Sali	Concentrazione sali in SSW (g/l)
NaCl	22
MgCl ₂ · 6H ₂ O	9,7
Na ₂ SO ₄ (anhydrous)	3,7
CaCl ₂ (anhydrous)	1,0
KCl	0,65
NaHCO ₃	0,20
H ₃ BO ₃	0,023

Tabella 20 – Stock solutions dei nutrienti

Nutrienti	Concentrazione nelle stock solutions	Concentrazione finale nelle test solutions
Stock solution 1		
FeCl ₃ · 6H ₂ O	48 mg/l	149 µg/l (Fe)
MnCl ₂ · 4H ₂ O	144 mg/l	605 µg/l (Mn)
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	45 mg/l	150 µg/l (Zn)
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,157 mg/l	0,6 µg/l (Cu)
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,404 mg/l	1,5 µg/l (Co)
H ₃ BO ₃	1140 mg/l	3,0 mg/l (B)
Na ₂ EDTA	1000 mg/l	15,0 mg/l
Stock solution 2		
Thiamin hydrochloride	50 mg/l	25 µg/l
Biotin	0,01 mg/l	0,005 µg/l
Vitamin B ₁₂ (cyanocobalamin)	0,10 mg/l	0,05 µg/l
Stock solution 3		
K ₃ PO ₄	3,0 g/l	3,0 mg/l; 0,438 mg/l P
NaNO ₃	50,0 g/l	50,0 mg/l; 8,24 mg/l N
Na ₂ SiO ₃ · 5H ₂ O	14,9 g/l	14,9 mg/l; 1,97 mg/l Si

Risultati

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

Tabella 21: valori di pH all'inizio e alla fine del test

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

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

Criteri di validità del controllo:

Il test è considerato valido perchè nel controllo:

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

Tabella 22: Risultati biologici: Yield e tasso di crescita dopo 72 ore di esposizione

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

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

Tabella 23: risultati degli endpoint: Biomassa e Tasso di crescita

Valore ricercato	Diluizione del campione – Percentuale di campione
NOEC	98,5%
LOEC	>98,5%
EyC50	>98,5%
ErC50	>98,5%

NOEC = concentrazione di non effetto

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

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

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

Conclusioni

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

SAGGI ECOTOSSICOLOGICI SUI SEDIMENTI

Saggio di tossicità acuta su *Corophium orientale*

Principio del metodo

Il saggio di mortalità con *Corophium orientale* a 10 giorni di esposizione è stato effettuato secondo la ISO 16712 (2005).

Per l'allestimento del saggio sono state utilizzati individui di *C. orientale*, con una taglia compresa nel range 500-750 µm, raccolti in campo ed acclimatati in laboratorio alle condizioni di esecuzione del test (salinità 36, temperatura 15±2 °C).

Il tossico di riferimento utilizzato è stato CdCl₂.

Il valore di EC₅₀ con il tossico di riferimento è risultato pari a 3,2 mg/L (2,75-3,33) a 96 h di esposizione.

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

Tabella 24: valori di pH dei campioni allestiti in camera di test

Codice campione	Valori pH Inizio test
Controllo negativo	8,09
1765-22	8,11
1766-22	8,05
1767-22	8,10
1768-22	8,08
1769-22	8,09

Tabella 25: valori di salinità dei campioni allestiti in camera di test

Codice campione	Valori salinità (‰)
Controllo negativo	36
1765-22	36
1766-22	36
1767-22	36
1768-22	36
1769-22	36

Tabella 26: valori di NH₄⁺ dei campioni allestiti in camera di test

Codice campione	Valori NH ₄ ⁺ (mg/L)
Controllo negativo	0-0,5
1765-22	2-3
1766-22	2
1767-22	2
1768-22	2-3
1769-22	3-5

Tabella 27: valori di Ossigeno disciolto dei campioni allestiti in camera di test

Codice campione	Valori ossigeno disciolto (%)
Controllo negativo	>85
1765-22	>85
1766-22	>85
1767-22	>85
1768-22	>85
1769-22	>85

Risultati

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

Tabella 28: test con *C. orientale* a 10 giorni eseguito su campioni di sedimento intero

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

I campioni di sedimento hanno evidenziato percentuali di effetto inferiori al 15%, indicando un'assenza di tossicità. Tuttavia, nel campione 1769-22 (A5) è stata osservata una mortalità media del 17%. A tale campione è stata quindi attribuita una bassa tossicità nei confronti di *C. orientale*.

Criteria di validità del controllo:

Il test è stato considerato valido in quanto:

- Il tasso di mortalità medio nel controllo negativo è stato $\geq 85\%$ e $\geq 80\%$ in ciascuna replica al termine dei 10 giorni di esposizione.

Conclusioni

In base ai test ecotossicologici effettuati sui campioni di sedimento non si è evidenziato un effetto tossico su *Corophium orientale* per tutti i campioni indagati, ad eccezione di un lieve effetto tossico nel test effettuato sul campione 2201406-005 (A5).

SAGGI ECOTOSSICOLOGICI SUL SUOLO ED ELUTRIATO

Sui campioni di suolo sono stati condotti studi di ecotossicità acuta su:

- crostaceo cladocero *Daphnia magna* Strauss (elutriato)
- verme di terra *Eisenia fetida*

Saggio di tossicità acuta su *Daphnia magna*

Principio del metodo

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

Sono stati preparati quattro becher per ciascun elutriato contenenti il campione tal quale (TQ), ottenuto attraverso il metodo descritto dalla normativa UNI EN 12457-2:2004, e quattro becher contenenti la sola acqua ricostituita (controllo negativo). In ciascun becher sono introdotti 5 dafnidi di età inferiore a 24 ore.

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

Dopo 24 e 48 ore dall'inizio dell'esposizione, è stata registrata l'immobilizzazione (vengono definiti immobili gli organismi che non sono in grado di muoversi entro 15 secondi dopo leggera agitazione della soluzione).

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

Composizione del mezzo acquoso

Per la preparazione del controllo negativo è stata utilizzata acqua ricostituita preparata in accordo alla linea guida OECD 202, 2004:

<u>Composizione</u>	<u>Concentrazione finale</u>
CaCl ₂ 2H ₂ O	294.0 mg/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	123.3 mg/L
NaHCO ₃	64.8 mg/L
KCl	5.8 mg/L

Risultati

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

Tabella 29: valori di pH all'inizio e alla fine del test

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

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

Tabella 30: valori della concentrazione di O₂ disciolto all'inizio e alla fine del test

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

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

Criteri di validità del test:

Il test è considerato valido perchè:

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

Tabella 31: Risultati biologici di immobilizzazione

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

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

Alla luce dei risultati ottenuti, l'EC₅₀ risulta maggiore del campione tal quale.

Tabella 32: Risultati dell'endpoint: Immobilizzazione

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

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

Saggio di tossicità acuta su *Eisenia fetida*

Principio del metodo

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 dei saggi sono state preparate quattro repliche per ciascun campione contenenti il suolo tal quale (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 costituita da un contenitore di vetro contenente circa 750 g di terreno (controllo negativo o campione) e 10 organismi da testare 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)

Composizione del suolo artificiale

Il terreno artificiale 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.

I campioni di suolo analizzati sono stati setacciati a 4 mm prima dell'utilizzo.

Risultati

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

Tabella 33: valori di pH all'inizio e alla fine del test

Tipologia di suolo	Valori pH Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo negativo	6.02 – 6.31
2201416-001	7.71 – 7.35
2201416-002	7.72 – 8.01
2201416-003	8.06 – 8.11
2201416-004	7.78 – 7.98

Tabella 34: WHC dei campioni espressa in % di peso secco

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

Tabella 35: Umidità espressa in % all'inizio e alla fine del test

Tipologia di suolo	Valori umidità (%) Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo negativo	38.0 – 35.2
2201416-001	28.8 – 24.1
2201416-002	32.9 - 27.5
2201416-003	29.0 – 25.5
2201416-004	36.3 – 29.4

Criteri di validità del test:

Il test è considerato valido in quanto:

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

Tabella 36: Risultati biologici di mortalità

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

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

Tabella 37: Risultati dell'endpoint: Mortalità

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

NOEC = concentrazione di effetto statisticamente non significativo

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

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

Conclusioni

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

SAGGIO DI GENOTOSSICITA'

Test di Ames

Si è effettuato un test di mutagenesi inversa batterica eseguendo il test di Ames sui campioni di acqua marina e sugli elutriati è stato eseguito il test di Ames utilizzando kit forniti da Xenometrix AG, Switzerland.

Principio del metodo

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

In questa modalità, ciascun ceppo batterico viene esposto al campione di prova (campione ambientale, controllo positivo o acqua sterile), per 90 minuti in un terreno contenente una quantità di istidina sufficiente per supportare circa due divisioni cellulari. Al termine dei 90 minuti, le colture in ciascuna condizione (controllo negativo, campioni di prova e controlli positivi) vengono diluite in un mezzo indicatore di pH privo di istidina o triptofano e distribuite omogeneamente all'interno di 48 micropozzetti di una piastra da 384 pozzetti e successivamente incubate per 48 ore a 37°C.

Durante l'incubazione, le cellule esposte a sostanze o campioni mutageni continueranno la divisione cellulare avendo subito la reversione della mutazione che li rende dipendenti da istidina. Il metabolismo dei batteri in crescita riduce il pH del mezzo, modificando il colore del micropozzetto in cui si trovano i batteri, passando dal viola al giallo. Il numero di pozzetti gialli contenenti colonie revertanti viene contato e confrontato con il controllo non trattato e con il controllo positivo. Ciascun campione è testato in triplicato per consentire l'analisi statistica dei dati.

L'obiettivo del test è la valutazione del potenziale mutageno dei campioni misurando la loro capacità di indurre mutazioni inverse in ceppi selezionati di *Salmonella typhimurium* (TA98 e TA100) in presenza e assenza di frazione microsomiale S9 di fegato di ratto trattato con Phenobarbital/ β -Naphthoflavone. La frazione S9 di omogenato di fegato di ratto si ottiene dopo la prima fase di centrifugazione a circa 9000xg e imita il metabolismo del fegato in sistemi di test in vitro. Le frazioni S9 del fegato sono usate come attivatori metabolici aggiunti al campione per sopperire alla incapacità dei batteri di metabolizzare alcuni composti.

Controlli positivi

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

Nella Tabella 5, sono riportate le caratteristiche dei controlli positivi utilizzati:

Tabella 38: elenco dei controlli positivi

Sostanza di riferimento per linea cellulare	Concentrazione /piastra	Ceppo S. typhimurium	Attivazione metabolica
Mix 2-nitrofluorene (2-NF) e 4-nitroquinoline N-oxide (4-NQO)	2 ug/mL + 0.1 ug/mL	TA 98 e TA 100	No (-S9)
2-aminoanthracene (2AA)	2.5 ug/mL	TA 98 e TA 100	Si (+S9)

Gruppo di controllo

Come controllo negativo nello studio è stata utilizzata acqua ultrapura sterilizzata in autoclave, in volume pari al volume di campione ambientale utilizzato (185 uL).

Medium

Growth medium

Fornitore: Xenometrix, AG, Switzerland;
Lot No.: PE10285P; Expiry date: 28 December 2023.

Exposure medium

Fornitore: Xenometrix AG, Switzerland;
Lot No.: QF09922P+X2110EA; Expiry date: 28 September 2024.

Indicator medium

Fornitore: Xenometrix AG, Switzerland;
Lot No.: QF03548P; Expiry date: 28 March 2024.

Test system

I ceppi di *Salmonella typhimurium* utilizzati nel saggio sono gli strains TA98 e TA100 e sono stati ottenuti da Xenometrix AG, Switzerland sotto forma di inoculi liofilizzati da conservare a -80°C.

Nella tabella seguente si riportano i dettagli dei ceppi.

Tabella 39: Caratteristiche dei ceppi batterici utilizzati

Linea cellulare	Lotto	Scadenza	Mutazione
<i>S. typhimurium</i> . TA98	36a	28 May 2024	hisD3052, frameshifts
<i>S. typhimurium</i> .TA100	41b	28 August 2024	hisG46, base-pair substitution

Attivazione metabolica

Il test è stato condotto in presenza e assenza di attivatore metabolico (S9) derivante da fegati di ratti trattati con Phenobarbital/ β -naphthoflavone.

La frazione S9 è stata aggiunta ai ceppi batterici sottoforma di S9 mix, una miscela contenente cofattori essenziali per l'S9.

Tabella 40: Caratteristiche dell'attivatore metabolico utilizzato

Attivatore metabolico	Lotto	Scadenza	Mutazione
S9	FA1774	07 September 2024	Xenometrix AGT, Switzerland
S9 mix	pco-21-388	28 October 2023	Xenometrix AGT, Switzerland

Procedura

Coltura batterica

I ceppi batterici TA98 e TA100 sono stati ricostituiti con Growth medium liquido e incubati per 14-16 ore in beute sterili contenenti Growth medium e ampicillina. La coltura è stata incubata su agitatore orbitale termostata a 37°C, 250 rpm. In parallelo è stato eseguito un controllo di sterilità aggiungendo 2 ml di Growth medium in una beuta sterile sottoposta alle medesime condizioni sperimentali ma senza inoculo batterico.

Al termine dell'incubazione, la crescita batterica è stata verificata prima visivamente e poi mediante assorbanza/torbidità a 600 nm.

Per l'esecuzione del saggio sono stati utilizzati solo i ceppi batteri con OD600 maggiore o uguale a 2 e associati al controllo di sterilità negativo ovvero non contaminato.

Trattamento e incubazione

Per l'allestimento del test sono state utilizzate micropiastre a 24 pozzetti contenenti i seguenti reagenti:

Attivazione metabolica	- S9	+ S9
Acqua sterile	15 uL	-
Exposure medium	25 uL	25 uL
Campione ambientale o acqua sterile o controllo positivo	185 uL	185 uL
Batteri	25 uL	25 uL
S9 mix	-	15 uL

Ciascun campione è stato testato in triplicato.

La piastra è stata incubata per 90 minuti a 37°C, 250 rpm.

Al termine dell'incubazione, in ciascun pozzetto è stato addizionato Indicator Medium (2.8 mL).

Il contenuto di ciascun pozzetto è quindi stato aliquotato in 48 pozzetti di una piastra a 384 pozzetti (50 uL/well) e la piastra è stata incubata a 37°C per 48 ore. È stata creata una piastra a 384 pozzetti per ciascun replicato sperimentale.

Scoring dei risultati

Al termine dell'incubazione di 2 giorni, le piastre sono state estratte dall'incubatore ed è stato registrato il numero di pozzetti gialli ovvero contenenti le colonie revertenti.

Si procede poi al calcolo della media e deviazione standard dei pozzetti positivi per ciascun campione (dai triplicati).

Si calcola poi la Fold Induction over the Baseline come segue:

Fold induction over baseline = numero medio di pozzetti positivi / (media + deviazione standard del controllo non trattato).

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

Risultati

Acqua marina

Criteri di validità del test:

Il test è considerato valido se:

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

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

Tabella 41: risultati di genotossicità delle acque marine espressa come Fold Induction

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

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

Elutriato del Suolo

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

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

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

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

Conclusioni

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

Firma del tecnico



Stefano Ceriati

29/07/2022

Data