



Tipo Documento: Relazione VO indagini ecogenotossicologiche matrice suolo

Codice documento: IMAG-70-A53-30-ARP00003-00

Rev. n. 00

Pagina 1 di 3

CENTRALE TERMOELETTRICA DI CASSANO D'ADDA
Impianto motori a gas

Relazione per la verifica di ottemperanza alla condizione ambientale inerente alle indagini ecogenotossicologiche sulla matrice suolo richiesta da ISS nel proprio parere AOO-ISS 12/01/2021 0000713, ai sensi dell'art. 5 del provvedimento di VIA n. 321 del 03/08/2021

APPLICA

A2A/DGE/BGT/GEN/ING

LISTA DI DISTRIBUZIONE

A2A/DGE/BGT/GEN/ING
AGG/AMD/ICA



LOGO E CODIFICA DEL FORNITORE



EMISSIONE

EMISSIONE					
00	07/2022	Emissione per VO	TAUW/A2A	O. Retini	C. De Masi
REV	DATA	DESCRIZIONE	REDAZIONE	VERIFICA	APPROVAZIONE

- Il documento approvato e firmato in originale è depositato presso l'archivio tecnico della S.O.-

Questo documento è proprietà del Gruppo A2A: non può essere utilizzato, trasmesso a terzi o riprodotto senza autorizzazione della stessa. Il Gruppo A2A tutela i propri diritti a norma di legge
Questo documento è stato predisposto da TAUW Italia s.r.l.: non può essere utilizzato, trasmesso a terzi o riprodotto senza autorizzazione della stessa. TAUW Italia s.r.l. tutela i propri diritti a norma di legge

INDICE

1 GENERALITÀ 3

1 GENERALITÀ

Il presente documento è stato predisposto al fine di ottemperare alla condizione ambientale inerente alle indagini ecogenotossicologiche sulla matrice suolo richiesta da ISS nel proprio parere AOO-ISS 12/01/2021 0000713, ai sensi dell'art. 5 del provvedimento di VIA n. 321 del 03/08/2021 di seguito richiamata:

Non è stato eseguito nessun saggio ecotossicologico su suolo poiché il Proponente afferma che per tale matrice il “rischio di inquinamento da parte di sostanze pericolose connesso all’esercizio della Centrale nell’assetto futuro, risulta un evento non credibile”. In assenza di dati e informazioni preesistenti per i suoli dell’area interessata, il proponente dovrebbe effettuare ugualmente una indagine ecotossicologica sul suolo come previsto dalla linea guida che andrà ripetuta nella successiva fase di monitoring, con lo scopo di valutare eventuali apporti della centrale sugli ecosistemi circostanti anche per ricaduta aria-suolo.

In Allegato 1 al presente documento si riporta la relazione che illustra gli esiti del monitoraggio condotto sulla matrice suolo per la fase ante operam. Si precisa che l’indagine condotta contempla due saggi di ecotossicità e uno di ecogenotossicità in modo da essere rispondenti a quanto osservato da ISS nel proprio parere sopra richiamato.

ALLEGATO 1

RELAZIONE TECNICA

Saggi di ecotossicità e genotossicità per la determinazione della qualità del suolo ante operam nelle aree interessate dalle massime ricadute di particolato secondario indotte dalle emissioni della Centrale Termoelettrica A2A gencogas S.p.A. di Cassano d'Adda nella configurazione di progetto

Committente

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

Laboratorio Incaricato (Ecotossicità)

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

Laboratorio Incaricato (Genotossicità)

TOXI-COOP ZRT
8230 Balatonfüred,
Arácsi út 97.
Hungary

SOMMARIO

SOMMARIO.....	2
OBIETTIVO DEL PROGETTO.....	3
IDENTIFICAZIONE DEI CAMPIONI.....	4
PUNTO DI CAMPIONAMENTO.....	5
LINEE GUIDA E METODI.....	6
DEFINIZIONI.....	6
PREPARAZIONE DELL'ELUTRIATO.....	7
SAGGIO DI GENOTOSSICITA'.....	7
Test di Ames.....	7
Principio del metodo.....	7
Procedura del test di AMES.....	9
Risultati.....	12
SAGGI ECOTOSSICOLOGICI.....	15
Saggio di tossicità acuta su <i>Daphnia magna</i>	15
Principio del metodo.....	15
Composizione del mezzo acquoso.....	15
Risultati.....	16
Saggio di tossicità acuta su <i>Eisenia fetida</i>	17
Principio del metodo.....	17
Composizione del suolo artificiale.....	17
Risultati.....	18
CONCLUSIONI.....	19

OBIETTIVO DEL PROGETTO

L'obiettivo del progetto è stato la caratterizzazione ecotossicologica ante operam del suolo ed il potenziale mutagenico delle acque da lisciviazione (elutriato) nel territorio interessato dalle massime ricadute medie annue di particolato secondario generatosi a partire dalle emissioni di NO_x e NH₃ della Centrale termoelettrica A2A gencogas di Cassano d'Adda (MI) nella configurazione futura, a valle della messa in esercizio dei nuovi motori a gas naturale che ha ricevuto parere positivo di compatibilità ambientale con Decreto VIA del MITE n.321 del 03/08/2021.

Per effettuare l'indagine è stato prelevato un campione di suolo nella suddetta area, individuata sulla base del modello di ricaduta implementato nell'ambito dello Studio di Impatto Ambientale.

Sul campione 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).

IDENTIFICAZIONE DEI CAMPIONI

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

Tabella 1: identificativo campione suolo

Identificazione campione	Suolo
Codice interno ChemService	2200001-00300
Data di ricevimento in laboratorio	04/01/2022
Quantità	~30 kg
Contenitore	Secchio

Tabella 2: identificativo campione acqua da lisciviazione del suolo

Identificazione campione	Acqua da lisciviazione
Nome campione	Elutriato da suolo 2200001-00300
Codice campione	2200001-00300
Data di preparazione	11/01/2022
Data di ricevimento in laboratorio	13/01/2022
Scadenza	48 h dallo scongelamento
Quantità	~500 mL
Contenitore	Bottiglia HDPE

PUNTO DI CAMPIONAMENTO

Il punto di campionamento è situato all'interno di un'area agricola.

La Figura 1 riporta la posizione del punto di campionamento rispetto alla Centrale e la Figura 2 riporta una foto del sito di campionamento.

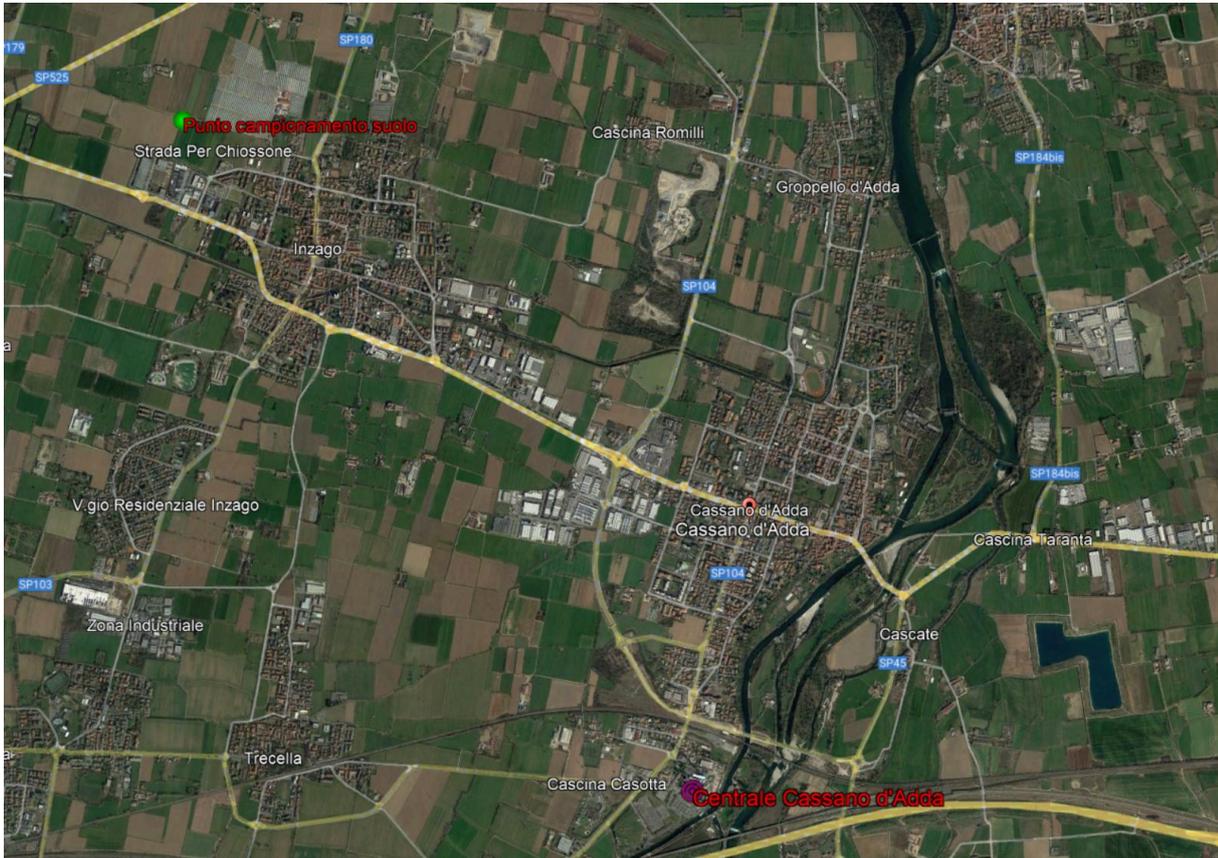


Figura 1: Punto di campionamento del suolo



Figura 2: Immagine del sito di campionamento del suolo

LINEE GUIDA E METODI

- OECD No. 202, 2004 - "*Daphnia sp.*, Acute Immobilization Test"
- OECD No. 207, 1984: Earthworm, Acute Toxicity Tests
- UNI EN 12457-2:2004: Characterization of waste; Leaching – Compliance test for leaching of granular waste materials and sludges.
- OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 4, No. 471, "Bacterial Reverse Mutation Test", adopted 21st July, 1997, Corrected 26th June 2020
- Commission Regulation (EC) No 440/2008 B13/14, Reverse Mutation Test Using Bacteria, dated May 30, 2008
- EPA Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870.5100 "Bacterial Reverse Mutation Test" EPA 712-C-98-247, August 1998
- ICH Guidance S2(R1): Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use, November 2011

DEFINIZIONI

Ecotossicità

- TQ: campione tal quale (acqua o suolo non diluito).
- 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 sugli organismi esposti durante il test.
- LC₅₀/EC₅₀: la concentrazione calcolata di sostanza test che causa la morte/un effetto avverso sul 50% degli organismi esposti.

Genotossicità

- Controllo positivo: gruppo trattato con una sostanza di riferimento specifico per dimostrare l'efficacia del test.
- Controllo negativo: gruppo trattato con un reagente che scioglie/veicola il campione da testare (DMSO, acqua ultrapura), ma senza il campione stesso.
- Controllo non trattato: gruppo non trattato (né con il campione da testare, né con la sostanza di riferimento, né con il solo veicolo).
- Mutazione rfa: mutazione che determina una maggior permeabilità della parete cellulare della parete batterica, rendendola più sensibile ai mutageni.

PREPARAZIONE DELL'ELUTRIATO

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

Il contenuto di umidità presente all'interno del suolo è stato determinato tramite essiccamento di un'aliquota di campione per 24 ore a 105°C (umidità pari a 18.2% del peso secco).

Nel presente caso l'elutriato è stato preparato trasferendo un'aliquota di 106.4 g di suolo (equivalente a 0.090 kg di campione secco) setacciato con setaccio a maglie di 4 mm all'interno di una bottiglia di vetro insieme a 884 mL di acqua deionizzata (corrispondente ad un rapporto L/S pari a 10 L/kg). La bottiglia è stata posta in agitazione all'interno di un miscelatore a rovesciamento settato a 10 giri/minuto per 24 ore.

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

Essendo 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 supernatante risultato dalla sedimentazione è stato posto in centrifuga per 30 minuti a 2000g. Successivamente il liquido supernatante risultato 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 25 minuti.

La soluzione risultante appariva limpida e presentava una colorazione marrone.

SAGGIO DI GENOTOSSICITA'

Sull'elutriato 2200001-00300 è stato eseguito il test di Ames.

Test di Ames

Principio del metodo

Il test di Ames svolto sul campione di elutriato (ottenuto attraverso il metodo descritto dalla normativa UNI EN 12457-2:2004) è stato effettuato secondo quanto descritto dall'OECD 417 "Bacterial Reverse Mutation Test".

L'obiettivo del test è la valutazione del potenziale mutageno dei campioni misurando la loro tendenza ad indurre mutazioni inverse in ceppi cellulari selezionati di *Salmonella typhimurium* (TA98 e TA100) in presenza e assenza di una miscela di enzimi attivatori metabolici (S9).

Per valutare la possibilità di precipitazione dei campioni in top agar e nel tampone fosfato si è effettuata una prova di solubilità in contemporanea con il test al fine di identificare il terreno da utilizzare.

Per identificare il potenziale mutageno del campione sono stati inclusi nel test 3 controlli positivi, un controllo negativo per ogni veicolo utilizzato ed un controllo non trattato.

Controlli positivi

È stato preparato un controllo positivo con una sostanza di riferimento specifico per ogni ceppo così da dimostrare l'efficacia del test.

Sotto vengono riportate le caratteristiche dei controlli positivi utilizzati:

Tabella 3: sommario dei controlli positivi

Attivazione metabolica	Sostanza di riferimento per linea cellulare	Veicolo	Concentrazione /piastra	Linea cellulare
Senza attivazione metabolica	4-Nitro-o-phenylenediamine (NPD)	DMSO	4 µg	<i>Salmonella</i> TA98
Senza attivazione metabolica	Sodium azide (SAZ)	Acqua ultrapura	2 µg	<i>Salmonella</i> TA100
In presenza di attivazione metabolica	2-aminoanthracene (2AA)	DMSO	2 µg	<i>Salmonella</i> TA98 e TA100

Controlli negativi (Controllo del veicolo)

Nello studio erano presenti due gruppi di controllo negativo allestiti con i due veicoli utilizzati nel test (acqua ultrapura e DMSO).

Medium

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

Fornitore: VWR International;

Produttore: MERCK KGaA, Germany*.

*Lot No.: 716399; Expiry date: 24 May 2022.

Test system

I ceppi cellulari testati *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 sono stati ottenuti da:

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

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

Sono state preparate stock di colture cellulari che sono state congelate in piastre a $-80 \pm 10^{\circ}\text{C}$.

Le colture utilizzate per il presente test sono riportate nella seguente tabella:

Tabella 4: identificativi delle colture cellulari utilizzate

Linea cellulare	Data di arrivo	Numero di lotto della coltura originale	Codice interno del laboratorio	Scadenza
<i>S.ty.mur.</i> TA98	19 January 2021	5491D	210205	05 February 2023
<i>S.ty.mur.</i> TA100	19 January 2021	5472D	210205	05 February 2023

Ogni ceppo testato presentava revertenti spontanei ad una propria frequenza.

I revertenti spontanei ai prototrofi di istidina vengono misurati frequentemente/rutinariamente e vengono espressi come numero di revertenti spontanei per piastra.

Prima dello svolgimento del test le colture batteriche congelate sono state incubate per circa 10-12 ore a 37°C al fine di iniziare il test con le colture in fase di replicazione esponenziale.

Per garantirne la qualità, la vitalità di ogni coltura cellulare è determinata piastrandolo 0.1 mL di soluzione contenente 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} and 10^{-8} cellule della piastra in agar.

Il numero di cellule vitali per entrambi i ceppi cellulari è stato di circa 10^9 cellule/mL.

Attivazione metabolica

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

Tale attivatore metabolico è stato fornito da:

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

La miscela completa di S9 (riferito a 1000 mL) è stata preparata fresca come segue:

500 mL di 0.2 M tampone sodio-fosfato freddo (pH 7.4),

100 mL di fegato di ratto omogenato (S9)

400 mL di una miscela di sali per l'S9 composta da: NADP Na (4 mM), D-glucodio-6-fosfato Na (5 mM), $MgCl_2 \times 6 H_2O$ (8 mM) e KCl (33 mM).

Procedura del test di AMES

Pre-incubation test

Prima di stendere il campione, la coltura batterica e la miscela S9, o il tampone fosfato, sono stati aggiunti in adeguate provette (3 repliche per ciascun controllo o concentrazione) per fornire un contatto diretto tra i batteri ed il campione (nel suo veicolo). Queste provette sono state agitate delicatamente e incubate per 20 minuti a 37°C in un incubatore contenente un piano oscillante.

Il contenuto delle provette durante l'incubazione è stato:

Veicolo o soluzioni test o sostanza di riferimento	100 μ L
Coltura cellulare dopo una notte di incubazione	100 μ L
Tampone fosfato (pH: 7.4) o S9	500 μ L

Al termine del periodo di incubazione sono stati aggiunti 2 mL di agar fuso. Questa soluzione è stata agitata e versata sulla superficie di una piastra MGA (3 piastre per il controllo o per concentrazione).

Le piastre sono state incubate a 37°C per circa 48 ore. Il test è stato effettuato in parallelo con i controlli: non trattato, veicolo, e positivo.

Di seguito viene riportato il contenuto delle piastre:

Tabella 5: sommario dei controlli

Sommario dei controlli					
Tipologia di controllo	Attivazione con S9	Media	Agar fuso	Controllo positivo specifico per ceppo cellulare	Tampone fosfato
Non trattato	-	-	+	-	+
Non trattato	+	-	+	-	-
Veicolo	-	+	+	-	+
Veicolo	+	+	+	-	-
Controllo positivo	-	-	+	+	+
Controllo positivo	+	-	+	+	-

Criteri di validità

Il test (pre-incubation test) è considerato valido se:

- i ceppi testati dimostrano presenza di mutazione rfa* e la delezione nel gene uvrB e la presenza del fattore R del plasmide pKM101;
- le colture batteriche presentano un numero di revertenti spontanei nel controllo del veicolo comparabile con il range di dati storici;
- la vitalità delle colture cellulari testate rientra circa in 10⁹ cellule/mL;
- 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 (di almeno 3.0 volte) di colonie revertenti al di sopra del valore medio del rispettivo controllo del veicolo;
- siano presenti almeno 5 concentrazioni analizzabili (per ogni ceppo). Per valutare i dati del test sono necessarie un minimo di tre concentrazioni non tossiche e/o non precipitate;
- per i composti di prova solubili e non tossici, la concentrazione di prova massima raccomandata è 5 mg/piastra o 5 µL/piastra (testare concentrazioni di 5 mg/piastre o 5 µL/piastre può esser considerato quando si valutano sostanze contenenti quantitativi sostanziali di impurezze potenzialmente mutagene).

L'insolubilità è valutata ad occhio nudo come precipitazione nella soluzione finale alle stesse condizioni del test.

Conta delle colonie

È determinato il numero di colonie nelle piastre non trattate, controllo del veicolo, controllo positivo e in quelle trattate, con conta manuale, valutata ad occhio nudo.

$$\text{Tasso di mutazione} = \frac{\text{Numero medio di revertenti nei trattati (o nei controlli)}}{\text{Numero medio di revertenti nel controllo del veicolo}}$$

Determinazione della citotossicità

Una concentrazione è considerata tossica se:

- viene osservato un minor numero di colonie rispetto alla media dei valori del controllo del veicolo e che questa riduzione sia concentrazione-dipendente
e/o
- il numero di colonie revertenti è inferiore al range dei dati storici
e/o
- sono presenti colonie puntiformi
e/o
- si verifica un ridotto sviluppo del “prato” di fondo.

Criteri di mutagenesi

Un campione viene considerato mutageno se:

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

Un incremento è considerato biologicamente rilevante se:

- nel ceppo *Salmonella typhimurium* TA100 il numero di colonie revertenti è almeno il doppio del tasso di reversione del controllo del veicolo.
- Nel ceppo *Salmonella typhimurium* TA98 il numero di colonie revertenti è almeno il triplo del tasso di reversione del controllo del veicolo.

Criterio per una risposta negativa:

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

Come descritto nelle linee guida, la rilevanza biologica dei risultati è il criterio utilizzato per l'interpretazione dei dati. Una valutazione statistica dei risultati non è considerata necessaria.

Risultati

Test di solubilità

Tabella 6: comportamento dei campione nelle condizioni test

Campione	Concentrazione (% v/v)	Apparenza della soluzione (100 µL di campione + 500 µL tampone fosfato + 2 mL top agar)	Concentrazione nelle provette test (µL/provetta)
Elutriato (2200001-00300)	100	Soluzione limpida e trasparente	100

Validità dei controlli

I ceppi utilizzati in questo studio hanno mostrato un numero di colonie revertenti in linea con il range di dati dello storico dei controlli.

Ogni batch di S9 utilizzato ha portato ad un'appropriata attività biologica.

Ognuno dei controlli positivi effettuati mostra l'incremento atteso (almeno di 3 volte il controllo del veicolo) del numero di colonie revertenti rientrando nel range storico dei controlli positivi.

Il numero di colonie revertenti spontanee dei controlli del veicolo effettuati con acqua ultrapura con e senza S9 è in linea con il range storico dei controlli.

Tutti i criteri di validità vengono rispettati ed il test risulta quindi accettabile.

Elutriato (2200001-00300)

Di seguito vengono riportati in tabella i risultati biologici ottenuti, sui ceppi cellulari indagati, per il campione di elutriato preparato secondo quanto descritto dalla UNI EN 12457-2:2004 con il campione di suolo prelevato.

Tabella 7: Risultati del test sull'elutriato ottenuto dal suolo con *S. typhimurium* TA98

Test Item:		Leachate obtained from a natural soil taken from natural field (2200001-00300)						
Date of Experiment:		22-24 February 2022						
Strain:		<i>Salmonella typhimurium</i> TA98						
Cell count (Overnight culture):		1.66 x 10 ⁹ CFU/mL						
Without Exogenous Metabolic Activation (-S9 Mix)								
Concentration (µL/plate)	Revertant per Plate			Mean	Observation	SD	Mutation Rate	
	1	2	3					
Untreated Control	10	22	20	17.3	-	6.43	0.93	
<i>DMSO Control</i>	18	14	22	18.0	-	4.00	1.00	
Water Control	22	13	21	18.7	-	4.93	1.00	
100	18	17	15	16.7	-	1.53	0.89	
50	24	21	20	21.7	-	2.08	1.16	
16	15	17	23	18.3	-	4.16	0.98	
5	17	23	28	22.7	-	5.51	1.21	
1.6	23	20	27	23.3	-	3.51	1.25	
NPD	<i>(4 µg/plate)</i>	418	396	376	396.7	-	21.01	22.04
With Exogenous Metabolic Activation (+S9 Mix)								
Concentration (µL/plate)	Revertant per Plate			Mean	Observation	SD	Mutation Rate	
	1	2	3					
Untreated Control	16	15	24	18.3	-	4.93	1.17	
<i>DMSO Control</i>	15	21	17	17.7	-	3.06	1.00	
Water Control	10	17	20	15.7	-	5.13	1.00	
100	27	25	24	25.3	-	1.53	1.62	
50	24	12	17	17.7	-	6.03	1.13	
16	21	17	15	17.7	-	3.06	1.13	
5	18	17	19	18.0	-	1.00	1.15	
1.6	18	13	18	16.3	-	2.89	1.04	
2AA	<i>(2 µg/plate)</i>	1012	976	1124	1037.3	-	77.18	58.72
SD:	Standard Deviation		-:	Normal background lawn development, no precipitate				
DMSO:	Dimethyl sulfoxide							
NPD:	<i>4-Nitro-1,2-phenylenediamine</i>							
2AA:	<i>2-Aminoanthracene</i>							
Remarks: Ultrapure water was applied as vehicle of the test item and DMSO was applied as vehicle of the positive control substances NPD and 2AA. The mutation rate obtained at the test item and untreated control refers to Ultrapure water. The mutation rate obtained at NPD and 2AA refers to DMSO.								

Tabella 8: Risultati del test sull'elutriato ottenuto dal suolo con *S. typhimurium* TA100

Test Item:		Leachate obtained from a natural soil taken from natural field (2200001-00300)					
Date of Experiment:		22-24 February 2022					
Strain:		<i>Salmonella typhimurium</i> TA100					
Cell count (Overnight culture):		1.14 x 10 ⁹ CFU/mL					
Without Exogenous Metabolic Activation (-S9 Mix)							
Concentration (μ L/plate)	Revertant per Plate			Mean	Observation	SD	Mutation Rate
	1	2	3				
Untreated Control	88	66	52	68.7	-	18.15	0.82
DMSO Control	61	67	57	61.7	-	5.03	1.00
Water Control	77	88	87	84.0	-	6.08	1.00
100	69	71	88	76.0	-	10.44	0.90
50	76	84	87	82.3	-	5.69	0.98
16	86	73	71	76.7	-	8.14	0.91
5	48	77	78	67.7	-	17.04	0.81
1.6	76	62	74	70.7	-	7.57	0.84
SAZ (2 μ g/plate)	960	772	994	908.7	-	119.57	10.82
With Exogenous Metabolic Activation (+S9 Mix)							
Concentration (μ L/plate)	Revertant per Plate			Mean	Observation	SD	Mutation Rate
	1	2	3				
Untreated Control	62	68	76	68.7	-	7.02	0.94
DMSO Control	64	73	79	72.0	-	7.55	1.00
Water Control	70	70	78	72.7	-	4.62	1.00
100	56	61	55	57.3	-	3.21	0.79
50	52	52	51	51.7	-	0.58	0.71
16	65	55	59	59.7	-	5.03	0.82
5	68	44	59	57.0	-	12.12	0.78
1.6	56	64	50	56.7	-	7.02	0.78
2AA (2 μ g/plate)	789	911	857	852.3	-	61.13	11.84
SD:	Standard Deviation			-:	Normal background lawn development, no precipitate		
DMSO:	Dimethyl sulfoxide						
SAZ:	<i>Sodium azide</i>						
2AA:	<i>2-Aminoanthracene</i>						
Remarks: Ultrapure water was applied as vehicle of the test item and the positive control substance: SAZ and DMSO was applied as vehicle of the positive control substance: 2AA. The mutation rate obtained at the test item, untreated control and at SAZ refers to Ultrapure water. The mutation rate obtained at 2AA refers to DMSO.							

In base ai risultati ottenuti, il campione non presenta attività mutagena o effetto citotossico sulle colture cellulari testate alle condizioni usate in questo studio.

SAGGI ECOTOSSICOLOGICI

Sul campione 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* sul campione 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 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 ogni 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 dopo 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).

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 sul campione tal quale (TQ) senza ricostituzione della soluzione.

pH delle soluzioni:

Diluizione del campione	Valori Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	6.98 – 7.44
TQ	6.83 – 6.76

(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.	7.12 – 7.55
TQ	7.43 – 7.48

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

Criteri di validità del test:

- Nel controllo negativo 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 è risultato valido in quanto tutti i criteri di validità sono stati rispettati.

Tabella 9: Risultati biologici di immobilizzazione

Tempo di esposizione (h)	Campione	Organismi esposti	Organismi immobilizzati	Percentuale di immobilizzazione (%)
24	Controllo neg.	20	0	0
	TQ	20	1	5
48	Controllo neg.	20	0	0
	TQ	20	5	25

NOTA: dopo 48 ore di esposizione la soluzione appare limpida con una colorazione marrone.

Risultati dell'endpoint: Immobilizzazione

Valore ricercato	Percentuale di campione
EC ₅₀	>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 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 (controllo negativo o campione) e 10 organismi 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 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.

Risultati

Il saggio di tossicità acuta su *Eisenia fetida* è stato condotto sul campione tal quale (TQ) con aggiunta di acqua deionizzata al fine di ottenere un'umidità del terreno di circa il 25% (corrispondente al 40% della WHC del campione setacciato a < 4mm).

pH del campione:

Tipologia di suolo	Valori Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	5.89 – 6.07
TQ	4.34 – 5.18

Umidità % del campione:

Tipologia di suolo	Valori (%) Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	33.3 – 38.6
TQ	27.1 – 26.3.

Criteri di validità del test:

Alla fine del test, la mortalità degli animali del controllo negativo non deve essere superiore al 10%.

Tabella 10: 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
	TQ	0/10	0/10	0/10	0/10	0/40	0

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

Risultati dell'endpoint:

Mortalità

Valore ricercato	Percentuale di campione
NOEC	TQ (100%)
LOEC	>TQ (>100%)
LC ₅₀	>TQ (>100%)

NOEC = concentrazione di non effetto

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

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

CONCLUSIONI

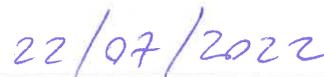
In base ai test effettuati sul campione di lisciviato del suolo prelevato all'interno di un terreno agricolo, situato nel territorio interessato dalle massime ricadute medie annue di particolato secondario generatosi a partire dalle emissioni di NO_x e NH₃ della Centrale termoelettrica A2A gencogas di Cassano d'Adda (MI) nella configurazione futura, si può concludere che non si sono riscontrati effetti mutageni o citotossici sui ceppi cellulari testati.

Per quanto riguarda l'ecotossicità, i test effettuati non hanno mostrato alcun effetto tossico su *E. fetida* mentre è stato osservato un leggero effetto tossico su *Daphnia magna*, comunque con un valore di EC₅₀ > del campione tal quale (effetto su meno del 50% della popolazione testata).

Firma del tecnico



Stefano Ceriati



Data