



Tipo Documento: Relazione VO indagini ecogenotossicologiche matrice acqua

Codice documento: IMAG-70-A53-30-ARP00011-00

Rev. n. 00

Pagina 1 di 4

CENTRALE TERMOELETRICA DI CASSANO D'ADDA

Impianto motori a gas

Relazione per la verifica di ottemperanza alle condizioni ambientali allegata al provvedimento di VIA n. 321 del 03/08/2021 inerenti alle indagini ecogenotossicologiche sulla matrice acqua del Canale Muzza formulate da ISS (parere prot. generale AOO-ISS-00713 del 12 gennaio 2021) e da Commissione Tecnica di Verifica dell'Impatto Ambientale - VIA e VAS (parere n. 92 del 26/04/2021)

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	06/2023	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

A2A SpA - Ingegneria

Centrale Termoelettrica Cassano d'Adda: Impianto motori a gas - Relazione per la verifica di ottemperanza alle condizioni ambientali allegate al provvedimento di VIA n. 321 del 03/08/2021 inerenti alle indagini ecogenotossicologiche sulla matrice acqua del Canale Muzza formulate da ISS (parere prot. generale AOO-ISS-00713 del 12 gennaio 2021) e da CTVIA - VIA e VAS (parere n. 92 del 26/04/2021) – IMAG70A5330ARP00011/00

INDICE

1 GENERALITÀ.....3

1 GENERALITÀ

Il presente documento riguarda il progetto "Centrale termoelettrica di Cassano d'Adda: impianto motori a gas" ed è stata predisposto al fine di ottemperare alle condizioni ambientali allegata al provvedimento di VIA del MiTE n. 321 del 03/08/2021 inerenti alle indagini ecogenotossicologiche sulla matrice acqua del Canale Muzza formulate da ISS (parere prot. generale AOO-ISS-00713 del 12 gennaio 2021) e Commissione Tecnica di Verifica dell'Impatto Ambientale - VIA e VAS (condizione ambientale n.4 del parere n. 92 del 26/04/2021), di seguito richiamate:

- **ISS – parere prot. generale AOO-ISS-00713 del 12 gennaio 2021**

Anche se per il crostaceo e per l'alga non si è rilevato alcuna tossicità, per quanto concerne il saggio su embrioni di pesce *Danio rerio*, si deve sottolineare che non è stata seguita la norma OECD 236/2013 come dichiarato, infatti la norma prevede l'esposizione di 20 uova per diluizione e non di 10 contrariamente a quanto eseguito dal laboratorio incaricato e l'osservazione della mortalità deve essere effettuata fino a 96 ore dopo l'esposizione e non solo fino a 48h. Pertanto, i risultati relativi a tale saggio non sono attendibili ed il test dovrebbe essere effettuato ai sensi della norma OECD. Inoltre la

[...]

Infine era stato richiesto un saggio di ecogenotossicità che non è stato eseguito né sulla matrice acqua né sul suolo.

Si ritiene pertanto che nelle future fasi di cantiere e di *monitoring*, il Proponente dovrà completare la valutazione ecotossicologica attenendosi a quanto già espresso nel parere ISS e nelle osservazioni della presente nota. Le attività eseguite durante la fase di cantiere dovranno essere oggetto di un report da inviare all'ISS per la verifica dei risultati conseguiti.

Centrale Termoelettrica Cassano d'Adda: Impianto motori a gas - Relazione per la verifica di ottemperanza alle condizioni ambientali allegata al provvedimento di VIA n. 321 del 03/08/2021 inerenti alle indagini ecogenotossicologiche sulla matrice acqua del Canale Muzza formulate da ISS (parere prot. generale AOO-ISS-00713 del 12 gennaio 2021) e da CTVIA - VIA e VAS (parere n. 92 del 26/04/2021) – IMAG70A5330ARP00011/00

• **Commissione Tecnica di Verifica dell'Impatto Ambientale - VIA e VAS - parere n. 92 del 26/04/2021**

Condizione ambientale n. 4	
Macrofase	Post operam
Fase	Fase di cantiere e fase esercizio
Ambito di applicazione	Salute pubblica
Oggetto della prescrizione	Si richiede che l'indagine ecotossicologica sulla matrice acqua del Canale Muzza venga ripetuta con frequenza annuale.
Termine per l'avvio della Verifica d'Ottemperanza	Fase di cantiere e dopo un anno dall'entrata in esercizio della nuova CTE, da ripetersi ogni anno
Ente vigilante	MITE- ISS
Enti coinvolti	

In Allegato 1 al presente documento si riporta la relazione che illustra gli esiti del monitoraggio genotossicologico ante operam condotto su campioni di acqua prelevati dal Canale Muzza che costituisce il corpo recettore degli scarichi idrici della Centrale termoelettrica A2A gencogas S.p.A. nella configurazione attuale autorizzata, e in quella futura, a seguito della realizzazione del progetto "Impianto motori a gas". Per effettuare l'indagine in data 04/01/2022 sono stati prelevati campioni di acqua dal Canale Muzza in due punti localizzati uno a monte ed uno a valle degli scarichi idrici della Centrale.

In Allegato 2 al presente documento si riporta la relazione che illustra gli esiti del monitoraggio ecogenotossicologico in fase di cantiere condotto su campioni di acqua prelevati dal Canale Muzza negli stessi punti indagati nella campagna di monitoraggio ante operam del settembre 2020 (i cui esiti sono stati presentati nell'ambito delle integrazioni cui è seguito il parere ISS prot. generale AOO-ISS-00713 del 12 gennaio 2021) e in quella del gennaio 2023 presentata nell'Allegato 1. Si specifica che per il saggio con il pesce Danio Rerio sono state recepite le osservazioni per l'esecuzione del test formulate da ISS nel proprio parere prot. generale AOO-ISS-00713 del 12/01/2021 e che l'indagine condotta contempla tre 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 genotossicità per la caratterizzazione ante operam del potenziale mutagenico del Canale Muzza a monte e a valle della Centrale Termoelettrica A2A gencogas S.p.A. di Cassano d'Adda

Committente

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

Laboratorio Incaricato (Genotossicità)

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

SOMMARIO

SOMMARIO	1
OBIETTIVO DEL PROGETTO	2
IDENTIFICAZIONE DEI CAMPIONI	2
PUNTI DI CAMPIONAMENTO	3
LINEE GUIDA E METODI	5
DEFINIZIONI	5
SAGGIO DI GENOTOSSICITA'	5
Test di Ames	6
Principio del metodo	6
Procedura del test di AMES	8
Risultati	10
CONCLUSIONI	16

OBIETTIVO DEL PROGETTO

L'obiettivo del progetto è stato quello di caratterizzare il potenziale mutagenico ante operam dell'acqua del Canale Muzza, che costituisce il corpo recettore degli scarichi idrici della Centrale termoelettrica A2A gencogas S.p.A. nella configurazione attuale autorizzata, e in quella futura, a seguito della realizzazione del progetto "Impianto motori a gas" che ha ricevuto parere positivo di compatibilità ambientale con Decreto VIA del MITE n.321 del 03/08/2021. Per effettuare l'indagine sono stati prelevati campioni di acqua dal Canale Muzza in due punti localizzati uno a monte ed uno a valle degli scarichi idrici della Centrale.

Sui campioni di acque superficiali prelevati è stato 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

Nella Tabella viene descritto come sono stati identificati i campioni analizzati.

Tabella 1: identificazione campioni acque

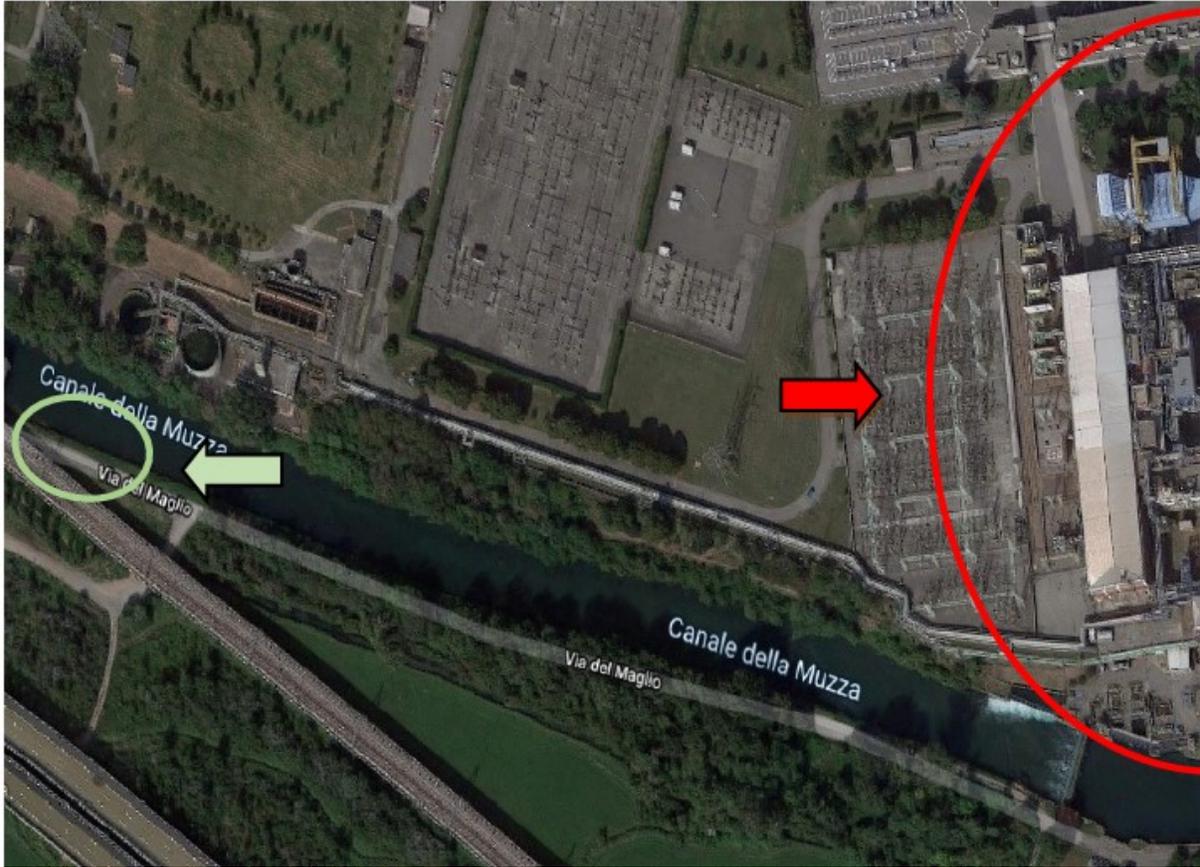
Identificazione campione	Acque
Nome campione	Acqua a monte; Acqua a valle
Codice campione	2200001-00100; 2200001-00200
Data di campionamento	04/01/2022
Data di ricevimento in laboratorio	13/01/2022
Scadenza	48 h dallo scongelamento
Quantità	~500 mL
Contenitore	Bottiglia HDPE

PUNTI DI CAMPIONAMENTO

Punto di campionamento a monte della Centrale (coordinate: 45°30'28.5"N 9°30'21.2"E)



Punto di campionamento a valle della Centrale (coordinate: 45°30'28.5"N 9°30'21.2"E)



LINEE GUIDA E METODI

- 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

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.

SAGGIO DI GENOTOSSICITA'

Sui campioni di acqua 2200001-00100, 2200001-00200 è stato eseguito il test di Ames.

Test di Ames

Principio del metodo

Il test di Ames svolto sui campioni di acque superficiali 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 2: 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 3: 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/routinariamente 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 4: 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	+	-	+	+	-

Criteria 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 10^9 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 μ L/piastra (testare concentrazioni di 5 mg/piastre o 5 μ L/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 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 5: 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)
Acqua Canale Muzza a valle dell'impianto (2200001-00100)	100	Soluzione limpida e trasparente	100
Acqua Canale Muzza a monte dell'impianto (2200001-00200)	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.

Acqua Canale Muzza a valle dell'impianto (2200001-00100)

Di seguito vengono riportati in tabella i risultati biologici ottenuti, sui due ceppi cellulari indagati, per il campione di acqua prelevato a valle degli scarichi idrici della centrale termoelettrica A2A gencogas di Cassano D'Adda (MI).

Tabella 6: Risultati del test sull'acqua a valle dell'impianto con *S. typhimurium* TA98

Test Item:		Water from Muzza Canal, downstream the thermoelectric plant (2200001-00100)						
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 (μ L/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	18	16	17.3	-	1.15	0.93	
50	19	16	22	19.0	-	3.00	1.02	
16	22	25	13	20.0	-	6.24	1.07	
5	15	17	21	17.7	-	3.06	0.95	
1.6	20	8	20	16.0	-	6.93	0.86	
NPD	<i>(4 μg/plate)</i>	418	396	376	396.7	-	21.01	22.04
With Exogenous Metabolic Activation (+S9 Mix)								
Concentration (μ L/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	29	18	22	23.0	-	5.57	1.47	
50	18	25	27	23.3	-	4.73	1.49	
16	26	12	14	17.3	-	7.57	1.11	
5	25	11	17	17.7	-	7.02	1.13	
1.6	13	24	19	18.7	-	5.51	1.19	
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: <i>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.</i>								

Tabella 7: Risultati del test sull'acqua a valle dell'impianto con *S. typhimurium* TA100

Test Item:		Water from Muzza Canal, downstream the thermoelectric plant (2200001-00100)						
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	
<i>DMSO Control</i>	61	67	57	61.7	-	5.03	1.00	
Water Control	77	88	87	84.0	-	6.08	1.00	
100	68	76	77	73.7	-	4.93	0.88	
50	85	73	85	81.0	-	6.93	0.96	
16	79	81	67	75.7	-	7.57	0.90	
5	76	73	88	79.0	-	7.94	0.94	
1.6	74	80	74	76.0	-	3.46	0.90	
SAZ	(2 μg/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	
<i>DMSO Control</i>	64	73	79	72.0	-	7.55	1.00	
Water Control	70	70	78	72.7	-	4.62	1.00	
100	61	64	52	59.0	-	6.24	0.81	
50	78	73	75	75.3	-	2.52	1.04	
16	63	64	67	64.7	-	2.08	0.89	
5	75	76	71	74.0	-	2.65	1.02	
1.6	66	63	59	62.7	-	3.51	0.86	
2AA	(2 μg/plate)	789	911	857	852.3	-	61.13	11.84
SD:	Standard Deviation			-:	Normal background lawn development, no precipitate			
DMSO:	Dimethyl sulfoxide							
SAZ:	Sodium azide							
2AA:	2-Aminoanthracene							
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.								

Acqua Canale Muzza a monte dell'impianto (2200001-00200)

Di seguito vengono riportati in tabella i risultati biologici ottenuti, sui ceppi cellulari indagati, per il campione di acqua prelevato a monte degli scarichi idrici della centrale termoelettrica A2A gencogas di Cassano D'Adda (MI).

Tabella 8: Risultati del test sull'acqua a monte dell'impianto con *S. typhimurium* TA98

Test Item:		Water from Muzza Canal, upstream the thermoelectric plant (2200001-00200)							
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	13	13	18	14.7	-	2.89	0.79	✓	
50	13	18	19	16.7	-	3.21	0.89	✓	
16	22	18	16	18.7	-	3.06	1.00	✓	
5	19	23	16	19.3	-	3.51	1.04	✓	
1.6	19	19	21	19.7	-	1.15	1.05	✓	
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	7	13	21	13.7	-	7.02	0.87	✓	
50	18	15	19	17.3	-	2.08	1.11	✓	
16	15	17	12	14.7	-	2.52	0.94	✓	
5	28	13	20	20.3	-	7.51	1.30	✓	
1.6	22	20	12	18.0	-	5.29	1.15	✓	
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 9: Risultati del test sull'acqua a valle dell'impianto con *S. typhimurium* TA100

Test Item:		Water from Muzza Canal, upstream the thermoelectric plant (2200001-00200)						
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	
<i>DMSO Control</i>	61	67	57	61.7	-	5.03	1.00	
Water Control	77	88	87	84.0	-	6.08	1.00	
100	72	84	85	80.3	-	7.23	0.96	
50	77	83	73	77.7	-	5.03	0.92	
16	80	82	66	76.0	-	8.72	0.90	
5	85	93	62	80.0	-	16.09	0.95	
1.6	64	76	79	73.0	-	7.94	0.87	
SAZ	<i>(2 μg/plate)</i>	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	
<i>DMSO Control</i>	64	73	79	72.0	-	7.55	1.00	
Water Control	70	70	78	72.7	-	4.62	1.00	
100	57	78	53	62.7	-	13.43	0.86	
50	61	64	59	61.3	-	2.52	0.84	
16	75	64	76	71.7	-	6.66	0.99	
5	66	73	82	73.7	-	8.02	1.01	
1.6	66	62	67	65.0	-	2.65	0.89	
2AA	<i>(2 μg/plate)</i>	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, tutti e due i campioni non presentano attività mutagena o effetto citotossico sulle colture cellulari testate alle condizioni usate in questo studio.

CONCLUSIONI

In base ai test effettuati sui campioni di acque prelevati dal Canale Muzza a monte ed a valle degli scarichi idrici della Centrale termoelettrica A2A gencogas di Cassano D'Adda (MI) non si sono riscontrati effetti mutageni o citotossici sui ceppi cellulari testati.

Firma del tecnico



Stefano Ceriati



Data

ALLEGATO 2

RELAZIONE TECNICA

SAGGI DI ECOGENOTOSSICITÀ PER LA DETERMINAZIONE DELLA QUALITÀ DEL CANALE MUZZA A MONTE E A VALLE DELLA CENTRALE A2A DI CASSANO D'ADDA - FASE DI CANTIERE PROGETTO "IMPIANTO MOTORI A GAS"

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

OBIETTIVO DEL PROGETTO

L'obiettivo del progetto è stato quello di caratterizzare, durante la fase di cantiere del progetto A2A gencogas S.p.A. denominato "Impianto motori a gas" e sito a Cassano d'Adda (MI), l'ecotossicità ed il potenziale mutagenico dell'acqua del Canale Muzza, che costituisce il corpo recettore degli scarichi idrici della Centrale termoelettrica A2A gencogas S.p.A. nella configurazione attuale autorizzata, e in quella futura, a seguito della realizzazione del progetto "Impianto motori a gas" che ha ricevuto parere positivo di compatibilità ambientale con Decreto VIA del MITE n.321 del 03/08/2021.

Per effettuare l'indagine eco-genotossicologica, l'acqua del canale Muzza è stata prelevata, negli stessi punti in cui è stato effettuato il primo campionamento a monte e a valle degli scarichi idrici della Centrale stessa. Su entrambi i campioni 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).

IDENTIFICAZIONE dei CAMPIONI

Identificazione campione	Acqua canale Muzza a monte dell'impianto	Acqua canale Muzza a valle dell'impianto
Codice interno ChemService	2202431-001	2202431-002
Data di prelievo e ricevimento in laboratorio	30/11/2022	
Orario di prelievo	11:30	11:10
Quantità	2L	
Contenitore	Bottiglia il HDPE	

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

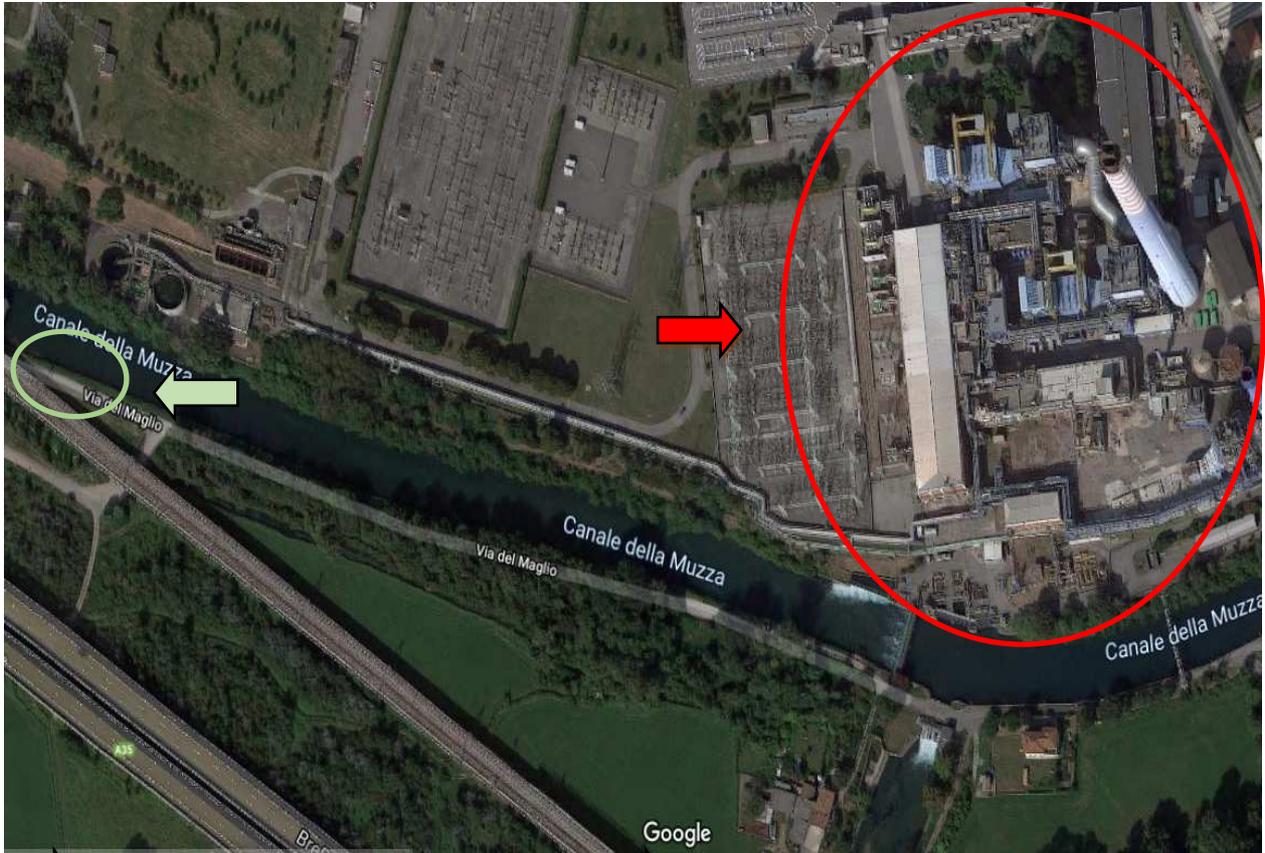
PUNTI DI CAMPIONAMENTO - IMMAGINI

Punto di campionamento a monte della Centrale (coordinate: 45°30'28.5"N 9°30'21.2"E)



 Centrale A2A gencogas di Cassano d'Adda  Punto di campionamento a monte dell'impianto.

Punto di campionamento a valle della Centrale (coordinate: 45°30'28.5"N 9°30'21.2"E)



 Centrale A2A gencogas di Cassano d'Adda  Punto di campionamento a valle dell'impianto

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. 236, 2013 - "Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test"
- 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

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%.
NOEC:	la concentrazione alla quale il campione non da effetti avversi sugli organismi.
TQ:	campione tal quale.

Test di Tossicità Acuta su *Daphnia m.*

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.

Test di Tossicità su Embrioni di Pesce

- 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.

Test di Ames

Test di mutazione inversa (reverse mutation): saggio eseguito con ceppi batterici di *Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli* per rilevare la reversione della mutazione che rende i batteri dipendenti da un aminoacido (rispettivamente istidina per *Salmonella* e/o triptofano per *E. coli*) il cui apporto esterno diviene quindi essenziale per la sopravvivenza del ceppo batterico. Un composto mutageno reverte la mutazione generando un ceppo indipendente dall'apporto esterno di questo aminoacido.

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 con 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.

FASE SPERIMENTALE

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:

<u>Nutrienti</u>	<u>Concentrazione nelle soluzioni stock</u>
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.

<u>Durata dello studio:</u>	72 ore
<u>Intensità luminosa:</u>	tra 4400 e 8800 Lux (illuminazione continua)
<u>Temperature:</u>	tra 21 e 24 °C (conforme al range raccomandato dalla OECD 201, 2011)

CAMPIONE: Acqua canale Muzza a Monte dell'impianto
CODICE CHEMSERVICE: 2202431-001

pH delle soluzioni:

Diluizione del campione	Valori Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	7.92 – 8.38
dil. 16	7.88 – 8.34
dil. 8	7.88 – 8.38
dil. 4	7.93 – 8.71
dil. 2	8.02 – 8.78
TQ	8.18 – 8.87

(conforme al massimo incremento di 1.5 punti durante il saggio OECD 201, 2011)

Criteri di validità del controllo: Fattore di crescita della biomassa: 117
(accettabile se ≥ 16);
Variazione media della rata di crescita: 4.8 %
(accettabile se ≤ 7)

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.	1253400	-	1,5812	-
dil. 16	1402600	0	1,6485	0
dil. 8	861800	0	1,6903	0
dil. 4	1253400	0	1,6671	0
dil. 2	1402600	0	1,6696	0
TQ	861800	0	1,6485	0

CAMPIONE: Acqua canale Muzza a Valle dell'impianto
CODICE CHEMSERVICE: 2202431-002

pH delle soluzioni:

Diluizione del campione	Valori Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	7.45 – 7.58
dil. 16	7.85 – 7.62
dil. 8	7.83 – 7.74
dil. 4	7.86 – 7.79
dil. 2	7.98 – 8.01
TQ	8.20 – 8.13

(conforme al massimo incremento di 1.5 punti durante il saggio OECD 201, 2011)

Criteri di validità del controllo:

Fattore di crescita della biomassa: 117
(accettabile se ≥ 16);
Variazione media del tasso di crescita: 4.8 %
(accettabile se ≤ 7)
Coeff. di variazione giornaliero del tasso di crescita: 27.4 %
(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.	1172600	-	1,5812	-
dil. 16	1376867	0	1,6407	0
dil. 8	1383400	0	1,6423	0
dil. 4	1258600	0	1,6108	0
dil. 2	1175000	0	1,5880	0
TQ	1234733	0	1,6048	0

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

Soluzioni stock

CaCl₂ 2H₂O
MgSO₄ 7H₂O
NaHCO₃
KCl

Concentrazione nella soluzione stock

11.76 g/L
4.93 g/L
2.59 g/L
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.

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)

CAMPIONE: Acqua canale Muzza a Monte dell'impianto
CODICE CHEMSERVICE: 2202431-001

pH delle soluzioni:

Diluizione del campione	Valori Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	7.86 – 7.99
TQ	7.22 – 7.08

(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.	6.72 – 7.00
TQ	8.16 – 7.89

(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: Acqua canale Muzza a Valle dell'impianto
CODICE CHEMSERVICE: 2202431-002

pH delle soluzioni:

Diluizione del campione	Valori Inizio test – fine test (media delle repliche)
Controllo neg.	7.86 – 7.99
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.	6.72 – 7.00
TQ	7.31 – 7.40

(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

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,

<u>Reagenti</u>	<u>Concentrazione in acqua</u>
CaCl ₂ 2H ₂ O	294.0 mg/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	123.3 mg/L
NaHCO ₃	63.0 mg/L
KCl	5.5 mg/L

La percentuale di fertilizzazione delle uova utilizzate per il test è stata l'84% 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: Acqua canale Muzza a Monte dell'impianto
CODICE CHEMSERVICE: 2202431-001

pH della campione:

Diluizione del campione	Valori Inizio test – Fine test
Controllo neg.	7.89 – 7.81
Controllo pos.	8.09 – 8.04
dil. 16	8.17 – 8.59
dil. 8	8.09 – 8.61
dil. 4	8.14 – 8.42
dil. 2	8.15 – 8.10
TQ	8.12 – 8.04

Concentrazione di ossigeno:

Diluizione del campione	Valori (%) Inizio test – Fine test
Controllo neg.	87.1 – 84.2
Controllo pos.	81.1 – 82.7
dil. 16	85.2 – 83.0
dil. 8	86.0 – 81.6
dil. 4	86.9 – 85.4
dil. 2	88.0 – 87.7
TQ	85.5 – 85.7

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

Risultati biologici:

Mortalità

Tempo di esposizione (h)	Diluizione del campione	Uova esposte	Uova schiuse	Uova morte	Percentuale di mortalità (%)
96	Controllo neg.	24	22	0	0
	Controllo pos.	20	0	20	100
	16	20	20	0	0
	8	20	19	0*	0
	4	20	20	0	0
	2	20	18	1	5
	TQ	20	16	4	20

*embrione/i malformato/i

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.

CAMPIONE: Acqua canale Muzza a Valle dell'impianto

CODICE CHEMSERVICE: 2202431-002

pH della campione:

Diluizione del campione	Valori Inizio test – Fine test
Controllo neg.	7.89 – 7.81
Controllo pos.	8.09 – 8.04
dil. 16	8.29 – 8.04
dil. 8	8.18 – 8.11
dil. 4	8.31 – 8.24
dil. 2	8.09 – 8.15
TQ	8.07 – 8.01

Concentrazione di ossigeno:

Diluizione del campione	Valori (%) Inizio test – Fine test
Controllo neg.	87.1 – 84.2
Controllo pos.	81.1 – 82.7
dil. 16	83.3 – 83.2
dil. 8	81.5 – 82.3
dil. 4	85.4 – 81.1
dil. 2	87.1 – 83.4
TQ	83.5 – 81.6

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

Risultati biologici:

Mortalità

Tempo di esposizione (h)	Diluizione del campione	Uova esposte	Uova schiuse	Uova morte	Percentuale di mortalità (%)
96	Controllo neg.	24	22	0	0
	Controllo pos.	20	0	20	100
	16	20	19	0	0
	8	20	18	0*	0
	4	20	19	0	0
	2	20	19	0	0
	TQ	20	18	1	10

*embrione/i malformato/i

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 ≥ 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.

SAGGIO DI GENOTOSSICITÀ – TEST DI AMES

Sui campioni di acqua 2202431-001 e 2202431-002 è stato eseguito il test di Ames con la metodica di pre-incubazione.

Principio del metodo

Il test di Ames svolto sui campioni di acque superficiali è stato effettuato secondo quanto descritto dall'OECD 417 "Bacterial Reverse Mutation Test" applicando la metodica di pre-incubazione.

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 preliminare al 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 condizione sperimentale (ceppo batterico e presenza/assenza di S9mix) così da dimostrare l'efficacia del test.

Sotto vengono riportate le caratteristiche dei controlli positivi utilizzati:

Tabella 2: sommario dei controlli positivi

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

Controlli negativi (Controllo del veicolo)

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

Medium

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

Fornitore: Merck

Produttore: MERCK KGaA, Germany*.

*Lot No.: 900105; Expiry date: 05/04/2023

Test system

I ceppi di *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 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 3: identificativi delle colture cellulari utilizzate

Linea cellulare	Data di arrivo	Lotto	Scadenza
<i>S.ty.mur.</i> TA98	06/09/22	5626D	06/01/2024
<i>S.ty.mur.</i> TA100	06/09/22	5638D	02803/2024

Prima dello svolgimento del test, un disco di ciascun ceppo batterico è stato incubato in Nutrient broth No 2 per circa 12-140 ore a 37°C al fine di iniziare il test con le colture in fase di replicazione esponenziale.

Al termine dell'agitazione, ciascuna coltura è mantenuta a temperatura ambiente avvolta in un foglio di alluminio per evitare la diretta esposizione alla luce.

L'avvenuta crescita si verifica mediante lettura spettrofotometrica a 650 nm (fino al raggiungimento di una OD650 tra 1.0 e 1.4) oppure mediante conta manuale in emocitometro.

Verificata l'avvenuta crescita si procede alla preparazione del top agar completo.

Attivazione metabolica

Il test è stato condotto in presenza e assenza di un attivatore metabolico (S9mix).

L'attivatore metabolico consiste nella frazione S9, preparata da fegati di ratti trattati con Phenobarbital/ β -naphthoflavone, e di alcuni cofattori.

La miscela di attivazione metabolica è stata fornita da:

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

Procedura del test di AMES

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.

Il contenuto delle provette durante l'incubazione è stato:

Veicolo o test item o sostanza di riferimento	100 μ L
Inoculo batterico	100 μ L
Tampone fosfato o S9 mix	500 μ L

Al termine del periodo di incubazione sono stati aggiunti 2 mL di top agar liquido. Dopodiché la soluzione è stata agitata e versata sulla superficie di una piastra MGA. Una volta solidificato il top agar, le piastre sono state incubate a 37°C per circa 48 ore.

Di seguito viene riportato il contenuto delle piastre:

Tabella 4: sommario dei controlli

Tipologia di controllo	DMSO	Controllo positivo	Tampone fosfato	Attivazione metabolica	Top Agar
Controllo negativo	-	-	+	-	+
Veicolo	+	-	+	-	+
Controllo positivo	-	+	+	-	+
Controllo negativo	-	-	+	-	+
Veicolo	+	-	-	+	+
Controllo positivo	-	+	-	+	+

Criteri di validità

Il 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 revertanti spontanei nel controllo del veicolo comparabile con il range di dati storici;
- la vitalità delle colture cellulari testate rientra circa in 10^9 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 2 volte) di colonie revertanti 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;
- 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 trattate, con conta manuale, valutata ad occhio nudo.

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

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 revertanti concentrazione-dipendente e/o
- una riproducibile risposta positiva biologicamente rilevante viene osservata alla più alta concentrazione di 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 tasso di reversione del controllo del veicolo.

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.

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

Il test di solubilità è stato condotto miscelando 100 µL di campione con 500 µL di tampone fosfato e 2 mL di top agar. Le osservazioni sono state effettuate ad occhio nudo valutando sia la miscela in fase liquida che in fase solida.

Tabella 5: comportamento dei campioni nelle condizioni test

Campione	Concentrazione (% v/v)	Apparenza della miscela	Concentrazione nelle provette test (µL/provetta)
2202431-001	100	Soluzione limpida, trasparente, assenza di precipitato	100
2202431-002	100	Soluzione limpida e trasparente, assenza di precipitato	100

Validità dei controlli

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

Il batch di S9 utilizzato ha mostrato ad un'appropriata attività biologica.

Ognuno dei controlli positivi effettuati mostra l'incremento del numero di colonie revertanti rientrando nel range storico dei controlli positivi.

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

CAMPIONE: Acqua canale Muzza a Monte dell'impianto
CODICE CHEMSERVICE: 2202431-001

Di seguito vengono riportati in tabella i risultati biologici ottenuti, sui due ceppi batterici indagati, per il campione di acqua prelevato a monte degli scarichi idrici della centrale termoelettrica A2A gencogas di Cassano D'Adda (MI).

Tabella 6: Risultati del test sull'acqua a monte dell'impianto con *S. typhimurium* TA98

Attivazione metabolica	Test Concentration (%)	REPLICATE			ELABORATION		ASSESSMENT	
		1	2	3	Mean	Standard Dev.	Mutation Rate	ALERT
S9-	Negative Control	13	14	16	14,3	1,5	1,10	NON MUTAGENIC
	0,5	15	10	14	13,0	2,6	1,00	NON MUTAGENIC
	1,6	12	16	17	15,0	2,6	1,15	NON MUTAGENIC
	5	11	15	16	14,0	2,6	1,08	NON MUTAGENIC
	16	16	17	19	17,3	1,5	1,33	NON MUTAGENIC
	50	16	10	14	13,3	3,1	1,03	NON MUTAGENIC
	100	8	10	11	9,7	1,5	0,74	NON MUTAGENIC
	Positive Control	110	124	115	116,3	7,1	8,95	MUTAGENIC
	DMSO*	14	12	13	13,0	1,0	0,91	NON MUTAGENIC
S9+	Negative Control	18	19	18	18,3	0,6	1,41	NON MUTAGENIC
	0,5	18	16	17	17,0	1,0	1,31	NON MUTAGENIC
	1,6	18	17	23	19,3	3,2	1,49	NON MUTAGENIC
	5	18	15	20	17,7	2,5	1,36	NON MUTAGENIC
	16	16	15	18	16,3	1,5	1,26	NON MUTAGENIC
	50	15	17	15	15,7	1,2	1,21	NON MUTAGENIC
	100	14	12	13	13,0	1,0	1,00	NON MUTAGENIC
	Positive Control	>300	>300	>300	>300	0	>17.71	MUTAGENIC
	DMSO*	17	16	18	17,0	1,0	0,93	NON MUTAGENIC

Il DMSO è utilizzato come solvente del controllo positivo.

Tabella 7: Risultati del test sull'acqua a monte dell'impianto con *S. typhimurium* TA100

Attivazione metabolica	Test Concentration (%)	REPLICATE			ELABORATION		ASSESSMENT	
		1	2	3	Mean	Standard Dev.	Mutation Rate	ALERT
S9-	Negative Control	86	80	94	86,7	7,0	1,00	NON MUTAGENIC
	0,5	72	69	75	72,0	3,0	0,83	NON MUTAGENIC
	1,6	94	85	72	83,7	11,1	0,97	NON MUTAGENIC
	5	75	72	70	72,3	2,5	0,83	NON MUTAGENIC
	16	78	85	94	85,7	8,0	0,99	NON MUTAGENIC
	50	87	106	83	92,0	12,3	1,06	NON MUTAGENIC
	100	86	91	87	88,0	2,6	1,02	NON MUTAGENIC
	Positive Control	270	280	282	277,3	6,4	3,20	MUTAGENIC
S9+	Negative Control	67	70	70	69,0	1,7	1,00	NON MUTAGENIC
	0,5	66	68	69	67,7	1,5	0,98	NON MUTAGENIC
	1,6	67	69	70	68,7	1,5	1,00	NON MUTAGENIC
	5	65	68	66	66,3	1,5	0,96	NON MUTAGENIC
	16	68	66	70	68,0	2,0	0,99	NON MUTAGENIC
	50	70	70	69	69,7	0,6	1,01	NON MUTAGENIC
	100	71	69	72	70,7	1,5	1,02	NON MUTAGENIC
	Positive Control	>300	>300	>300	>300	0,0	>4,52	MUTAGENIC
DMSO*	66	66	68	66,7	1,2	0,97	NON MUTAGENIC	

Il DMSO è utilizzato come solvente del controllo positivo nel saggio con attivazione metabolica

CAMPIONE: Acqua canale Muzza a Valle dell'impianto
CODICE CHEMSERVICE: 2202431-002

Di seguito vengono riportati in tabella i risultati biologici ottenuti, sui ceppi batterici indagati, per il campione di acqua prelevato a valle degli scarichi idrici della centrale termoelettrica A2A gencogas di Cassano D'Adda (MI).

Tabella 8: Risultati del test sull'acqua a valle dell'impianto con *S. typhimurium* TA98

Attivazione metabolica	Test Concentration (%)	REPLICATE			ELABORATION		ASSESSMENT	
		1	2	3	Mean	Standard Dev.	Mutation Rate	ALERT
S9-	Negative Control	8	17	6	10,3	5,9	1,00	NON MUTAGENIC
	0,5	6	9	10	8,3	2,1	0,81	NON MUTAGENIC
	1,6	6	9	15	10,0	4,6	0,97	NON MUTAGENIC
	5	12	10	9	10,3	1,5	1,00	NON MUTAGENIC
	16	11	11	8	10,0	1,7	0,97	NON MUTAGENIC
	50	10	7	12	9,7	2,5	0,94	NON MUTAGENIC
	100	16	9	16	13,7	4,0	1,32	NON MUTAGENIC

	Positive Control	117	118	100	111,7	10,1	9,31	MUTAGENIC
	DMSO*	11	10	15	12,0	2,6	1,16	NON MUTAGENIC
S9+	Negative Control	20	21	19	20,0	1,0	1,00	NON MUTAGENIC
	0,5	19	15	20	18,0	2,6	0,90	NON MUTAGENIC
	1,6	18	17	23	19,3	3,2	0,97	NON MUTAGENIC
	5	19	16	23	19,3	3,5	0,97	NON MUTAGENIC
	16	16	17	20	17,7	2,1	0,88	NON MUTAGENIC
	50	16	17	14	15,7	1,5	0,78	NON MUTAGENIC
	100	15	16	12	14,3	2,1	0,72	NON MUTAGENIC
	Positive Control	>300	>300	>300	>300	0,0	>17,71	MUTAGENIC
	DMSO*	17	16	18	17,0	1,0	0,85	NON MUTAGENIC

*Il DMSO è utilizzato come solvente del controllo positivo.

Tabella 9: Risultati del test sull'acqua a valle dell'impianto con *S. typhimurium* TA100

Attivazione metabolica	Test Concentration (%)	REPLICATE			ELABORATION		ASSESSMENT	
		1	2	3	Mean	Standard Dev.	Mutation Rate	ALERT
S9-	Negative Control	75	94	84	84,3	9,5	1,00	NON MUTAGENIC
	0,5	91	78	86	85,0	6,6	1,01	NON MUTAGENIC
	1,6	60	86	77	74,3	13,2	0,88	NON MUTAGENIC
	5	63	72	65	66,7	4,7	0,79	NON MUTAGENIC
	16	67	72	66	68,3	3,2	0,81	NON MUTAGENIC
	50	69	67	70	68,7	1,5	0,81	NON MUTAGENIC
	100	60	62	68	63,3	4,2	0,75	NON MUTAGENIC
	Positive Control	253	250	255	252,7	2,5	3,00	MUTAGENIC
S9+	Negative Control	61	62	89	70,7	15,9	1,00	NON MUTAGENIC
	0,5	62	57	54	57,7	4,0	0,82	NON MUTAGENIC
	1,6	60	57	53	56,7	3,5	0,80	NON MUTAGENIC
	5	58	57	77	64,0	11,3	0,91	NON MUTAGENIC
	16	50	59	77	62,0	13,7	0,88	NON MUTAGENIC
	50	60	72	62	64,7	6,4	0,92	NON MUTAGENIC
	100	41	45	50	45,3	4,5	0,64	NON MUTAGENIC
	Positive Control	>300	>300	>300	>300	0,0	>4,43	MUTAGENIC
	DMSO*	72	62	70	68,0	5,3	0,96	NON MUTAGENIC

Il DMSO è utilizzato come solvente del controllo positivo nel saggio con attivazione metabolica

RISULTATI E CONCLUSIONI

I dati ottenuti nei saggi eco-genotossicologici eseguiti sui campioni di acqua del canale Muzza sono stati elaborati e analizzati al fine di determinare la presenza di effetti tossici e/o mutageni.

I risultati ottenuti sono qui riportati:

Metodo	U.M.	2202431-001 campione a monte dell'impianto	2202431-002 campione a valle dell'impianto	Inizio - Fine prova
Saggio di tossicità su crostaceo <i>Daphnia magna</i>	NOEC	TQ	TQ	30/11/2022 – 02/12/2022
Saggio di tossicità su alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	NOEC	>TQ	>TQ	02/12/2022 – 05/12/2022
	EC ₅₀	>TQ	>TQ	02/12/2022 – 05/12/2022
Saggio di tossicità su uova di pesce <i>Danio rerio</i>	LC ₅₀	>TQ	>TQ	02/12/2022 – 06/12/2022
Test di Ames	MR	<2 Non Mutageno	<2 Non Mutageno	12/12/2022 – 16/12/2022

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 ai test effettuati sui campioni di acque prelevati dal Canale Muzza sia a monte che a valle degli scarichi idrici della Centrale termoelettrica A2A gencogas di Cassano D'Adda (MI) non si sono riscontrati effetti ecotossicologici o mutageni significativi.

Nel test di Ames sono state testate 6 concentrazioni di campione dal 100% allo 0.5% in quanto in particolare il campione 2202431-002 ha mostrato un lieve effetto citotossico alla concentrazione del 100%. Comunque, tale effetto non compromette la non mutagenicità del campione.

I risultati della batteria di test sulla presente campagna di campionamento sono risultati comparabili con quelli ottenuti dal primo campionamento avvenuto il 04/01/2022.

Firma del tecnico



Stefano Ceriati

04/07/2023

Data