



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE**

Alla c.a.
Ing. Mauro Pergetti
Dott.ssa Anna Salsi
IREN AMBIENTE SpA

INVIATOTRAMITE PEC

Oggetto: Esito del monitoraggio della mutagenicità delle matrici ambientali (suolo e particolato atmosferico – PM_{2,5}), prelevate nell'area circostante l'impianto di incenerimento di rifiuti di Parma, eseguito mediante test di reversione genica sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* e test della Cometa (Comet Assay) su leucociti umani.

Presso il Laboratorio di Genotossicologia Umana, Microbica e Vegetale del Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità ambientale dell'Università di Parma, sono stati effettuati il test di mutagenesi su *Salmonella typhimurium*, con i ceppi TA98 e TA100, e il test della Cometa (Comet assay) su leucociti umani su 6 campioni di particolato atmosferico – PM_{2,5} - e 6 campioni di terreno.

I siti di campionamento del PM e dei suoli sono indicati nella cartina allegata (Allegato 1). I campioni di particolato atmosferico sono stati prelevati dai tecnici dello Studio Alfa di Reggio Emilia, secondo modalità concordate con il Laboratorio di Genotossicologia Umana, Microbica e Vegetale del Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità ambientale (Dip. SCVSA) dell'Università di Parma ed in accordo con le modalità utilizzate negli anni precedenti dal Laboratorio Tematico Mutagenesi Ambientale di Arpa. Ogni campione di PM è costituito da 2 membrane (Tab.1) su cui è stato raccolto il particolato atmosferico, corrispondenti ai periodi di campionamento indicati nell'Allegato 2. I campioni di PM_{2,5} sono pervenuti al Laboratorio di Genotossicologia Umana, Microbica e Vegetale del Dip. SCVSA dell'Università di Parma al termine del periodo di campionamento.

I campioni di suolo sono stati prelevati, negli stessi siti del PM, dai tecnici dello Studio Alfa di Reggio Emilia, il 28 febbraio 2017, in presenza dei tecnici del Laboratorio di Genotossicologia Umana, Microbica e Vegetale del Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità ambientale dell'Università di Parma e con modalità concordate con il Laboratorio Tematico Mutagenesi Ambientale di Arpa.

I siti di campionamento per i test di mutagenesi sono indicati dalle sigle: MUT1, MUT2, MUT3, MUT4, MUT5, MUT6 corrispondenti ai terreni TM1, TM2, TM3, TM4, TM5, TM5_BIS (ex TM_B1) e ai campioni di particolato atmosferico CA1, CA2, CA3, CA4, CA5 e CA5_BIS (ex CA_B1).



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

Si ricorda che:

- ✓ i siti MUT1, MUT2, MUT3 sono a distanze diverse dal sito dell'impianto (MUT1 è il più distante e MUT3 è il più vicino all'impianto), lungo un gradiente di ricaduta delle emissioni dello stesso, e tutti egualmente distanti dall'autostrada;
- ✓ il sito contraddistinto dalla sigla MUT4 è in una zona interessata da "confondenti" presenti nell'area oggetto dell'indagine, ma non dall'impianto;
- ✓ i siti MUT5 e MUT6 sono al di fuori dell'area di ricaduta dell'impianto, in zone non interessate da attività industriali, e considerati "bianchi" di riferimento.

I campioni di terreno sono stati prelevati in zone non coltivate, con minima crescita di vegetazione, quella eventualmente presente è stata eliminata manualmente e sono state evitate le zone protette da alberi. Ogni campione di terreno è composto da sub-campioni prelevati in un'area di circa cinque – dieci metri quadrati intorno alle coordinate X e Y determinate con GPS (Tab.1). I campionamenti sono stati effettuati raccogliendo il terreno in zone di circa 10 x 10 cm ad una profondità media di 3 cm fino ad un massimo di 5 cm.

Nella presente relazione si riportano i risultati della campagna di monitoraggio 2017.

Tabella 1 – Siti di campionamento e corrispondenti campioni di suolo e di particolato atmosferico

Sigla del sito	Sigla campioni suolo	Sigla campioni PM	Codici membrana PM _{2,5} (Studio Alfa)	Ubicazione del punto di indagine	Coordinate UTM
MUT1	TM1	CA1	1579 1580	Strada Viazza di Beneceto	X: 610186; Y: 4964547
MUT2	TM2	CA2	1575 1577	Pedrignano – Strada Traversante	X: 608930; Y: 4965379
MUT3	TM3	CA3	1564 1578	Paradigna- Via Burla	X: 607803; Y: 4965685
MUT4	TM4	CA4	1569 1573	Strada Veronica – incrocio canale Naviglio	X: 607409; Y: 4967436
MUT5	TM5	CA5	1563 1567	Strada Borghetto	X: 605575; Y: 4968903
MUT6	TM5BIS	CA5BIS	1568 1570	Vicomero – Chiesa San Rocco	X: 604870; Y: 4970772



Trattamento dei campioni

Campioni di terreno

I suoli sono stati trattati secondo quanto previsto dalla linea guida dell'APAT: "Guida tecnica su metodi di analisi per il suolo e i siti contaminati APAT, RTI_SSC 2/2002". I campioni di terreno sono stati sminuzzati e ripuliti da sassi, residui vegetali, insetti, ecc. e sono stati posti ad asciugare al buio in armadio termostato a +30°C come temperatura massima. Una volta asciutti, sono stati setacciati, con setaccio a maglie di 2 mm, e quindi sottoposti ad estrazione chimica nel Laboratorio di Chimica Bio-inorganica del Dipartimento SCVSA tramite apparato Soxhlet, con una miscela 1/1 di Acetone/Esano. Contemporaneamente all'estrazione di ogni campione di terreno è stata effettuata la determinazione del peso secco, dopo sosta di una aliquota in stufa a +105°C per 24 ore (Allegato 3). Prima dell'esecuzione dei test di mutagenesi il residuo secco è stato risospeso in Dimetilsolfossido (DMSO RPE) in modo da ottenere una concentrazione di 10 grammi di terreno per ml di solvente per entrambi i test.

Campioni di particolato atmosferico

I campioni di particolato atmosferico, costituiti da 2 filtri per ciascun punto di prelievo, prelevati in periodi differenti da Studio ALFA (Tab.2), sono stati sottoposti ad estrazione chimica nel Laboratorio di Chimica Bio-inorganica del Dip. SCVSA, tramite apparato Soxhlet, in acetone (Allegato 3). Prima dell'esecuzione dei test di mutagenesi il residuo secco è stato risospeso in Dimetilsolfossido in modo da ottenere un rapporto tra il volume dell'aria campionata e il volume del solvente di 50 m³/ml per il test su Salmonella e di 1000 m³/ml per il test della Cometa su leucociti. La determinazione del peso delle polveri è stata effettuata dal laboratorio di analisi che ha effettuato il campionamento (Studio Alfa).

Tabella 2 – Periodi di campionamento del particolato atmosferico PM_{2,5}

Sito campionamento	Periodo campionamento
CA1	dal 13/02 al 20/02/2017
CA2	dal 27/02 al 06/03/2017
CA3	dal 20/02 al 27/02/2017
CA4	dal 13/03 al 20/03/2017
CA5	dal 06/03 al 13/03/2017
CA5 BIS	dal 20/03 al 27/03/2017



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

Test su Salmonella

Gli estratti dei campioni sono stati sottoposti a test di mutagenesi con i ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* (metodo di incorporazione in piastra) in accordo con i metodi standard (Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat Res 1983; 113: 173-215). Nel test su *Salmonella typhimurium* (test di Ames) si utilizzano ceppi di batteri recanti differenti mutazioni nel gene codificante per la sintesi dell'istidina, che li rendono incapaci di crescere in assenza di questo aminoacido. La positività del test viene valutata sul numero dei batteri che riacquistano la capacità di crescere in assenza di istidina, in seguito ad una seconda mutazione, dovuta all'esposizione a sostanze genotossiche (principio della retromutazione). I batteri che riacquistano tale capacità sono detti revertenti.

L'utilizzo di due ceppi di *Salmonella typhimurium* permette di evidenziare danni genetici, a livello di una o poche coppie di basi nel DNA (mutazioni puntiformi) di due diversi tipi, in particolare il ceppo TA98 rileva mutazioni per inserzione o delezione di basi, mentre il ceppo TA100 rileva mutazioni per sostituzione di basi.

Per distinguere le sostanze che per esercitare la loro azione mutagena devono essere metabolizzate (promutageni), come ad esempio gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA), da quelle che possono agire sul DNA direttamente (mutageni diretti), come ad esempio i nitroderivati degli IPA, tutti i test su *S. typhimurium* vengono condotti con e senza attivazione metabolica esogena. A tal fine si utilizza la frazione microsomiale epatica di ratto "S9" ottenuta da ratti nei quali è stata stimolata l'attività degli enzimi epatici (ratti indotti con Aroclor1254).

Per ogni campione sono state saggiate tre concentrazioni:

- PM_{2,5}: 2, 4 e 8 m³ di aria equivalenti;
- Suoli: 0.4, 0.8 e 1.6 grammi di suolo (in peso secco) equivalenti.

Per ogni concentrazione sono state eseguite tre repliche indipendenti. Per ogni test (TA98 con, TA98 senza, TA100 con, TA100 senza attivazione metabolica) le colonie di revertenti sono state contate dopo 48 ore di incubazione delle piastre in termostato a +37°C.

Test della Cometa

Il test della Cometa, o Comet assay, evidenzia rotture a singolo e a doppio filamento del DNA, rilevando un danno pre-mutageno nelle singole cellule non ancora riparato, né fissato.



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

Il test viene eseguito in accordo con il metodo di Singh *et al.* (Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175: 184-191): leucociti di donatori sani vengono incubati con concentrazioni scalari di estratto per 1 ora a +37°C. Dopo l'incubazione le cellule vengono lisate e il DNA viene sottoposto a corsa elettroforetica, su vetrino, in tampone fortemente alcalino (pH>13). I vetrini vengono, quindi, analizzati con microscopio a fluorescenza mediante marcatura del DNA con sostanza visibile agli UV (Bromuro di Etidio). In questa fase il DNA delle singole cellule appare come una cometa dotata di testa e di coda, la cui lunghezza e intensità luminosa sono proporzionali alla quantità di DNA migrato nella corsa elettroforetica e quindi al danno subito dalle cellule.

Per ogni campione sono state saggiate tre concentrazioni:

- PM_{2,5}: 2.5, 5 e 10 m³ di aria equivalenti;
- Suoli: 0.15, 0.3 e 0.6 grammi di suolo (in peso secco) equivalenti.

Per ogni concentrazione sono state eseguite due repliche indipendenti.

Valutazione e rappresentazione dei dati

Test su *Salmonella*

Per stabilire la positività (mutagenicità) dei campioni si applica il criterio del raddoppio (two-fold rule), cioè un campione si considera positivo quando il rapporto tra il numero dei revertenti indotti e il numero dei revertenti spontanei (controllo negativo) è ≥ 2 (Chu KL, Patel KM, Lin AH, Tarore RE, Linhart MS, Dunkel VC. Evaluating statistical analysis and reproducibility of mutagenicity assay. *Mutat Res* 1981; 85: 119-132).

Per l'analisi quantitativa sono stati considerati sia i campioni positivi (rapporto trattato/controllo ≥ 2) che quelli che presentano rette di regressione con $R^2 \geq 0.70$, da cui sono stati ricavati i valori dei revertenti/m³ di aria aspirata equivalenti (da cui si ricava il valore dei revertenti/ μ g di particolato) e dei revertenti/g di terreno, rappresentati dai coefficienti angolari delle rispettive rette di regressione lineare, considerando solo il tratto lineare della curva dose/risposta al fine di eliminare l'interferenza dovuta all'eventuale presenza di effetto tossico o di altri effetti inibenti.

Per le analisi di comparazione tra trattamenti, condizioni ed campagne di campionamento si è proceduto mediante analisi per campioni correlati che confronta automaticamente i dati osservati con i dati ipotizzati utilizzando il test di McNemar, il test Q di Cochran, il test dei ranghi con segno



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

di coppie corrispondenti di Wilcoxon o ANOVA a 2 vie di Friedman per ranghi. Il test scelto varia in base ai dati.

Test della Cometa

Il danno al DNA viene misurato sia mediante percezione visiva (visual score) al microscopio dei diversi gradi di danno alle cellule, suddividendole in classi a cui viene associato uno specifico valore detto SCORE (con valori da 0 a 400, indicando con 400 la classe più danneggiata), sia mediante sistema computerizzato di analisi dell'immagine (Comet assay IV, Perceptive Instruments, UK). Fra i parametri utilizzati dal programma per descrivere le comete è stata scelta la percentuale di intensità di fluorescenza nella coda della cometa (Tail Intensity - %TI), parametro raccomandato in letteratura, che definisce l'effetto genotossico del campione misurando la quantità di DNA migrato rispetto al totale. Per ogni dose vengono misurate duecento cellule scelte a caso (100 cellule in ciascuna replica).

Il potenziale effetto tossico degli estratti è valutato subito dopo il trattamento come riduzione della vitalità cellulare (mortalità), utilizzando il metodo Hoescht/Bromuro di Etidio: una dose viene definita "tossica" quando la mortalità cellulare supera il 30%.

Inoltre, durante la fase di lettura, viene valutata la percentuale di cellule "hedgehogs" (porcospino) ovvero cellule fortemente danneggiate che presentano nuclei completamente dispersi, in cui non è possibile rilevare una coda e una testa della cometa.

I dati sono stati analizzati usando il pacchetto statistico IBM SPSS Statistics Ver.24: la positività di un campione viene definita mediante test ANOVA, il coefficiente angolare delle rette di regressione dose-effetto dei campioni positivi e di quelli che presentano un $R^2 \geq 0.70$ fornisce l'incremento netto di revertenti indotto dal campione in esame.

Ai risultati di entrambi i test è stata applicata sia statistica parametrica (utilizzando il pacchetto statistico SPSS 24): per il confronto tra i siti e tra le condizioni sperimentali all'interno della stessa campagna di monitoraggio sono state applicate sia Anova (con *post hoc* di Bonferroni) che il confronto fra i coefficienti angolari b delle rette di regressione.

Per le analisi di comparazione tra campagne di campionamento si è proceduto mediante analisi per campioni correlati che confronta automaticamente i dati osservati con i dati ipotizzati utilizzando il test di McNemar, il test Q di Cochran, il test dei ranghi con segno di coppie corrispondenti di Wilcoxon o ANOVA a 2 vie di Friedman per ranghi. Il test scelto varia in base ai dati.



Risultati

Campioni di particolato atmosferico (PM_{2.5})

Test su Salmonella

Tutti i campioni di particolato atmosferico (PM) sono risultati positivi (rapporto trattato/controllo ≥ 2) nei test con il ceppo TA98 di *Salmonella typhimurium* in entrambe le condizioni considerate (con e senza S9), ad eccezione del campione CA2 con attivazione metabolica. Tutti i campioni sono risultati negativi con il ceppo TA100, tranne il campione CA1 risultato positivo senza attivazione metabolica. Questo evidenzia in generale, una prevalenza di sostanze che inducono mutazioni nel DNA per inserzione e/o delezione di coppie di basi, rilevabili con il ceppo TA98 di Salmonella. In tutti i saggi condotti sul ceppo TA98, con tutti i campioni analizzati si osserva una maggiore sensibilità nel test condotto in assenza di attivazione metabolica esogena (ANOVA, $p < 0.05$), evidenziando una prevalenza di sostanze che agiscono sul DNA direttamente e che possono essere detossificate dagli enzimi metabolici (Fig.1 e Tab.3-4).

Tabella 3 - Revertenti indotti per m³ di aria nei ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium*, in presenza (+S9) e in assenza di attivazione metabolica esogena, calcolati per i campioni positivi (rapporto trattato/controllo ≥ 2) e per quelli che presentano rette di regressione con $R^2 \geq 0.70$.

Campione	Numero di revertenti indotti /m ³ di aria				Numero di revertenti indotti / μ g di PM _{2.5}			
	TA98	TA98 +S9	TA100	TA100 +S9	TA98	TA98 +S9	TA100	TA100 +S9
CA1	19	10	28	0	0.363	0.191	0.534	0.000
CA2	9	3	0	0	0.134	0.045	0.000	0.000
CA3	23	6	15	8	0.245	0.064	0.160	0.085
CA4	13	3	0	0	0.121	0.028	0.000	0.000
CA5	6	3	0	0	0.155	0.078	0.000	0.000
CA5BIS	9	3	0	0	0.072	0.024	0.000	0.000

L'analisi dei numeri di revertenti indotti per m³ di aria, che ci fornisce un'informazione sul potenziale genotossico del quantitativo di aria respirata, rileva l'induzione di un numero di revertenti maggiore da parte dei campioni prelevati nei siti CA1 e CA3 e nel sito CA4 (Fig. 1). L'unico campione che induce una risposta positiva (raddoppio della frequenza di revertenti spontanei) anche nel ceppo TA100 è il campione CA1. Il numero di revertenti indotti per μ g di PM_{2.5}, che definisce la potenza mutagena del particolato, risulta più elevato nel campione CA1 e CA3 (Fig. 2). La valutazione statistica condotta mediante test Anova (posthoc Bonferroni) evidenzia

significative differenze solo tra il campione CA1 e i campioni CA5 e CA5BIS ($p < 0.05$) e solo quando vengono analizzati i risultati inerenti il numero di revertenti indotti per μg di $\text{PM}_{2.5}$

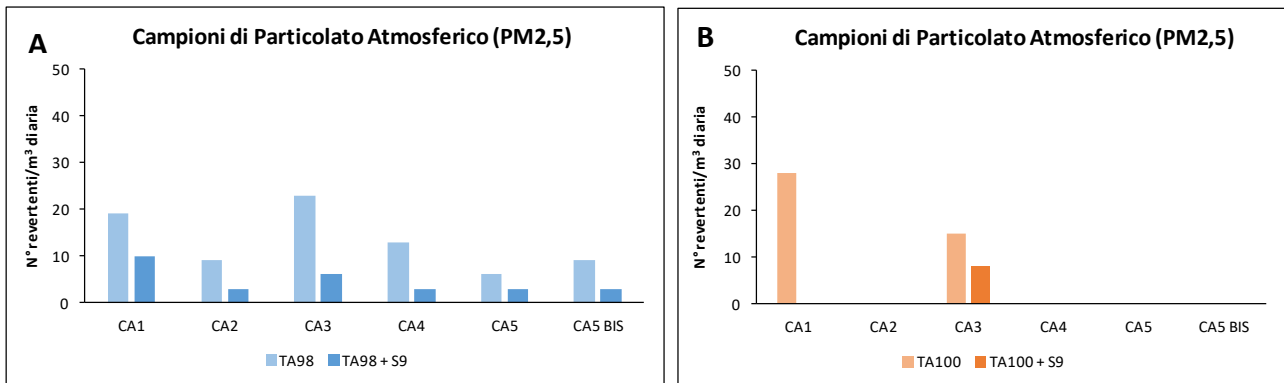


Figura 1 - Revertenti indotti per m^3 di aria nei ceppi TA98 (A) e TA100 (B) di *Salmonella typhimurium*, in presenza (+S9) e in assenza di attivazione metabolica esogena, calcolati per i campioni positivi (rapporto trattato/controllo ≥ 2) e per quelli che presentano rette di regressione con $R^2 \geq 0.70$.

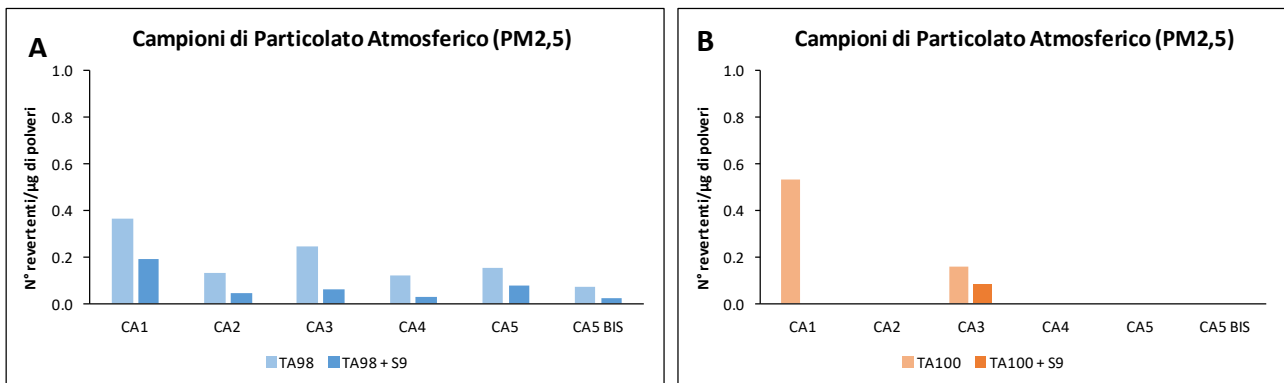


Figura 2 - Revertenti indotti per μg di polveri nei ceppi TA98 (A) e TA100 (B) di *Salmonella typhimurium*, in presenza (+S9) e in assenza di attivazione metabolica esogena, calcolati per i campioni positivi (rapporto trattato/controllo ≥ 2) e per quelli che presentano rette di regressione con $R^2 \geq 0.70$.

I campioni di particolato atmosferico sono stati prelevati in periodi diversi (Tab 2), in particolare i campioni CA1 e CA3, che presentano le attività mutagene più elevate, sono stati prelevati nel mese di febbraio, tutti gli altri campioni nel mese di marzo. Il diverso periodo di campionamento è



un parametro importante per comprendere l'andamento dei dati di mutagenicità del particolato che è noto avere un andamento stagionale con picchi nei mesi freddi (novembre-febbraio). Comparando i dati con la precedente campagna di monitoraggio (2015), emerge che nell'anno 2017 la concentrazione di particolato atmosferico risulta in generale più elevata in tutti punti di campionamento, tranne nei periodi in cui il particolato è stato prelevato nei siti CA2 e CA5 che presentano una concentrazione comparabile nei due anni considerati.

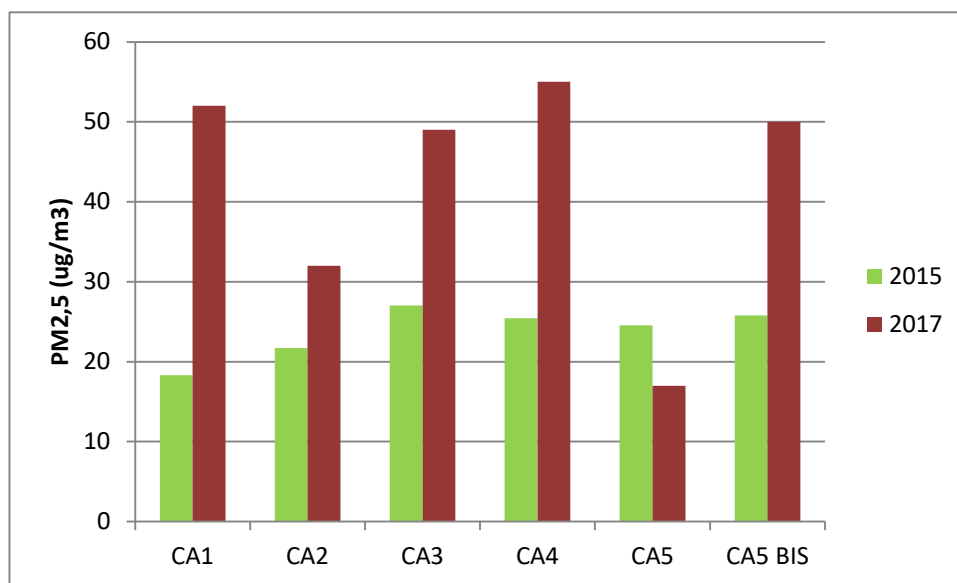


Figura.3 -Concentrazione di particolato atmosferico PM_{2,5} (µg/m³) nei vari siti di prelievo nelle campagne di monitoraggio 2015 e 2017.

Per quanto riguarda la mutagenicità del particolato nelle due campagne analizzate, si osserva una generale omogeneità nei dati sia prendendo in considerazione il dato espresso per m³ di aria sia quello per µg di polveri (Fig. 4). L'analisi comparativa svolta mediante test non parametrico per campioni correlati (test dei ranghi di Wilcoxon) non evidenzia differenze statisticamente significative nei test condotti con i due ceppi sia con che senza attivazione metabolica. L'analisi relativa ai vari campioni nelle due stagioni non presenta differenze statisticamente significative. Nel dettaglio si può comunque rilevare che nel 2017, rispetto al 2015, si osserva una maggiore presenza di molecole ad attività diretta rilevabili con il ceppo TA98 nei campioni CA1 e CA3 e per CA1 anche con il ceppo TA100. Viceversa si osserva la diminuzione di attività mutagena rilevabile con il ceppo TA100 nei campioni prelevati nel sito CA2 (test dei ranghi con segno di Wilcoxon, $p=0.068$) e nel sito CA5. Se si prende in considerazione l'induzione di revertenti per µg di polveri,

che fornisce un'indicazione sul carico genotossico specifico delle polveri, si osserva una generale diminuzione della mutagenicità specifica in tutti i campioni e in tutte le condizioni nell'anno 2017.

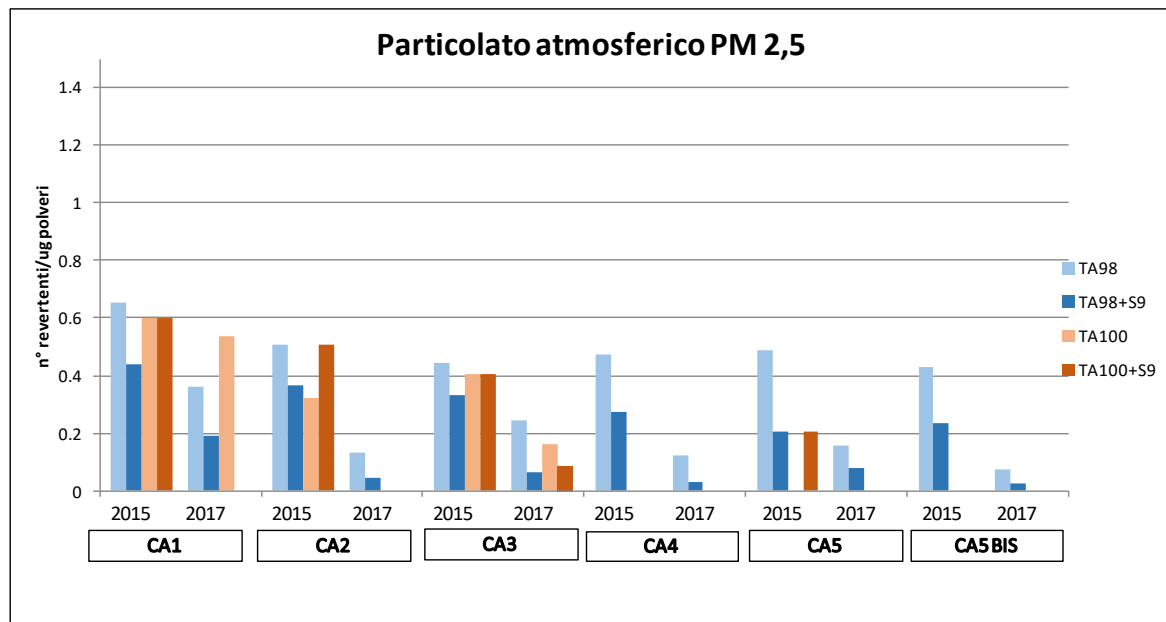
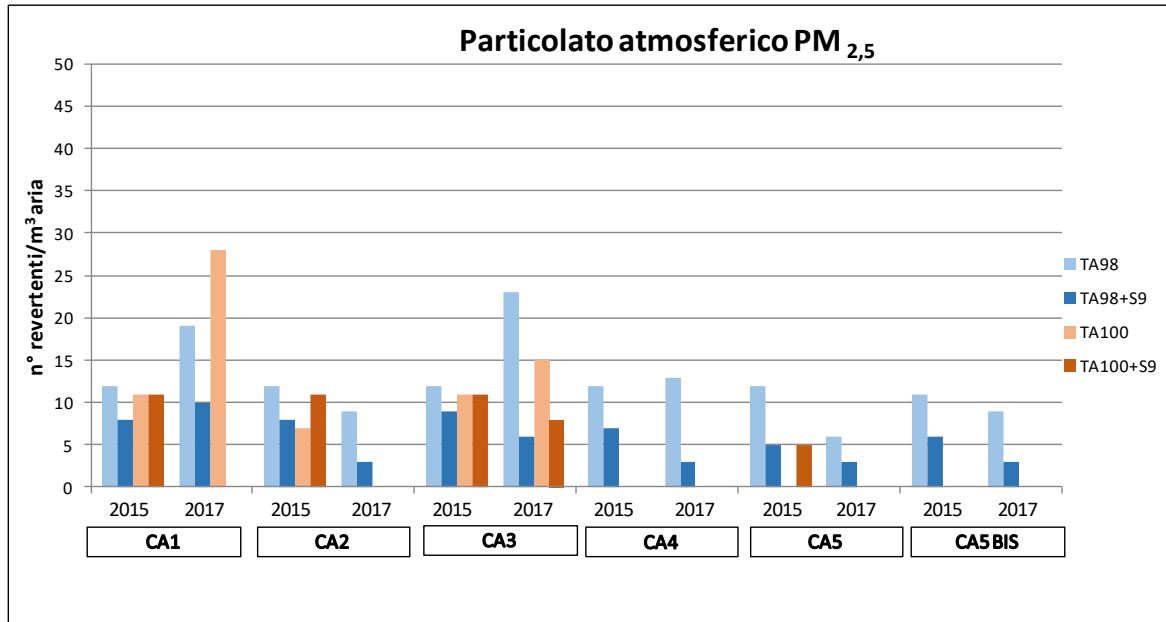


Figura 4 - Confronto relativo alla mutagenicità, espressa sia come numero di revertenti/m³ di aria (A) sia come numero di revertenti/µg di particolato PM_{2,5}, rilevata nelle campagne di monitoraggio 2015 e 2017. Vengono riportati i dati ottenuti sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* con e senza attivazione metabolica esogena (+).



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE**

Test della Cometa

In Figura 5 vengono riportati gli incrementi di danno al DNA rilevato tramite la percentuale di fluorescenza nella coda (%TI) calcolata sia con sistema computerizzato di analisi dell'immagine (A,B) che con l'analisi visiva dell'operatore al microscopio – SCORE – (C,D) e l'incremento della percentuale di cellule “hedgehogs” (E).

Solo il campione CA1 ha evidenziato un blando effetto sulla vitalità cellulare (mortalità cellulare = 33%) dopo il trattamento. È stata rilevata induzione di effetti tossici durante la lettura del Comet assay, rilevabili dall'aumento di cellule “hedgehogs”, con DNA completamente frammentato, per i campioni CA1 e CA4 (Fig. 5E).

L'incremento di danni al DNA, rilevato sia misurando il danno mediante sistema computerizzato di analisi dell'immagine (Fig.5 A,B) che mediante SCORE (Fig.5 C,D), indotto dai campioni di PM_{2,5} prelevati in zona di ricaduta (CA1, CA2) e nel campione CA4 prelevato in zona di controllo, caratterizzata dalla presenza di confondenti, risulta statisticamente significativo nel test ANOVA con analisi *post hoc* di Bonferroni (CA1, TI% $p < 0.01$ SCORE $p < 0.001$; CA2 TI% e SCORE $p = 0.06$ e CA4, TI% e SCORE < 0.01).

L'analisi comparata tra le campagne di monitoraggio 2015 e 2017 restituisce dati completamente sovrapponibili; non si rilevano differenze statisticamente significative.

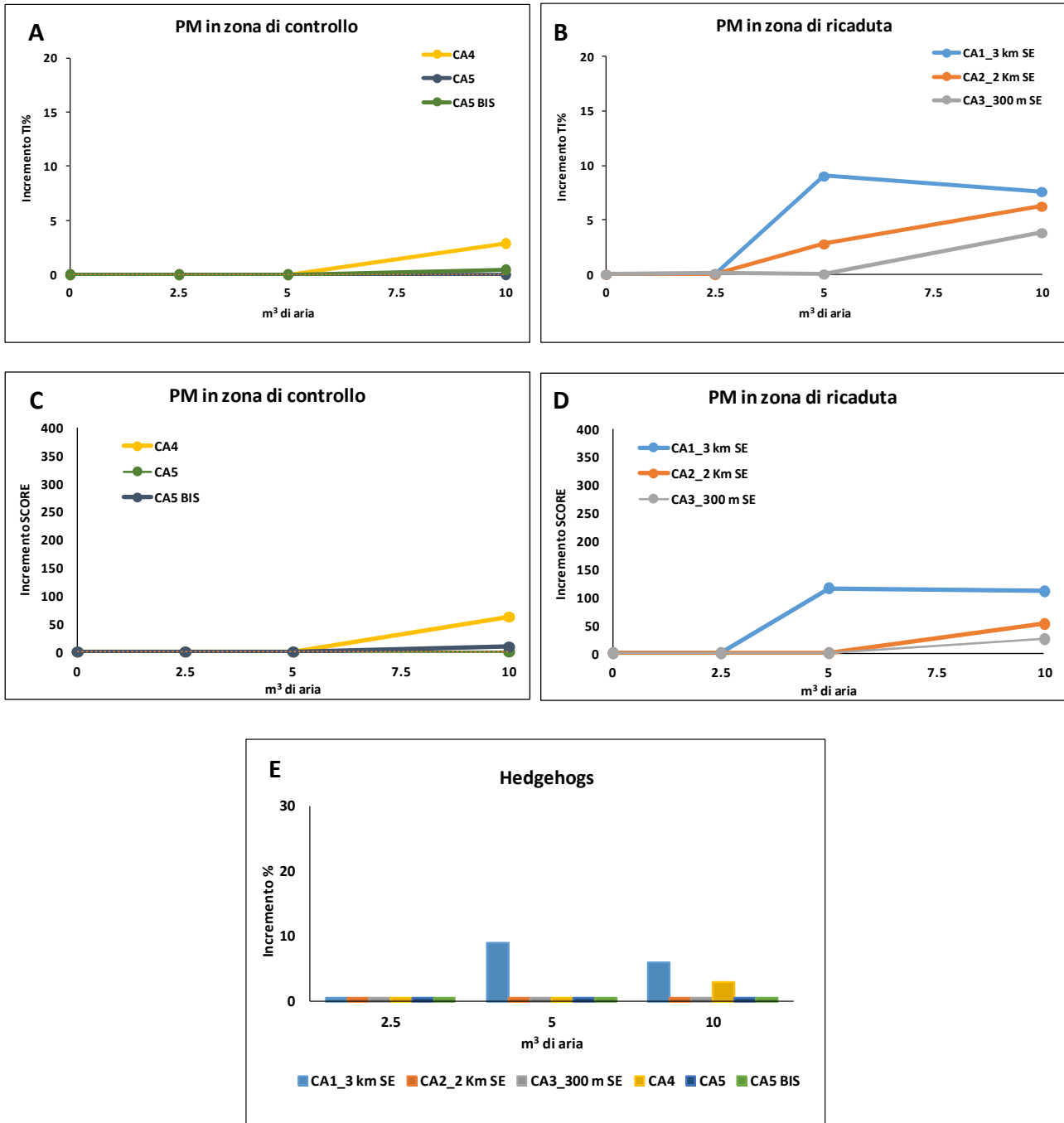


Figura 5 – Incremento di danno al DNA rilevato tramite la percentuale di fluorescenza nella coda (%TI) calcolata con sistema computerizzato di analisi dell’immagine (A,B) e analisi visuale dell’immagine – SCORE – (C,D) e incremento della percentuale di cellule “hedgehogs” (porcospino) (E), in leucociti umani trattati con estratti di particolato atmosferico prelevato nei siti indicati.



Campioni di terreno

Test su Salmonella

Tutti i campioni di suolo analizzati sono risultati positivi (rapporto trattato/controllo ≥ 2) con il ceppo TA98 e con il ceppo TA100, con e senza attivazione metabolica. Dal confronto dei sei campioni (Tab.4, Fig.6), il campione TM5 presenta l'attività mutagenica più elevata nel caso del ceppo TA98 con e senza attivazione metabolica e nel ceppo TA100 senza attivazione metabolica. A seguire troviamo il campione TM4 per il ceppo TA98 e il campione TM5_BIS per il ceppo TA100 senza attivazione metabolica. Nel caso del ceppo TA100 con attivazione metabolica il campione con la maggiore mutagenicità sembra essere il TM5_BIS e a seguire il campione TM5. In generale, i campioni TM1 e TM2 risultano essere i meno mutageni, questi campioni risultano significativamente diversi dal campione TM5 (TM1 $p < 0.01$; TM2 $p < 0.01$; ANOVA, post-hoc Bonferroni). L'analisi statistica rivela una significativa differenza tra i test condotti senza o con attivazione metabolica (Test t di Student, $p < 0.05$; test dei ranghi con segno di Wilcoxon $p = 0.07$). Si evidenzia un incremento di revertenti maggiore nei test condotti senza attivazione metabolica.

Tabella 4 - Revertenti indotti per grammo di terreno (in peso secco), nei ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium*, in presenza (+S9) e in assenza di attivazione metabolica esogena, calcolati per i campioni positivi (rapporto trattato/controllo ≥ 2) e per quelli che presentano rette di regressione con $R^2 \geq 0.70$.

Campione	Numero di revertenti indotti /g di terreno			
	TA98	TA98 + S9	TA100	TA100 + S9
TM1	64	62	114	66
TM2	115	100	121	78
TM3	131	126	167	128
TM4	156	153	120	135
TM5	228	195	281	122
TM5 BIS	142	118	204	153

Si conferma quanto già riscontrato nelle campagne precedenti e cioè che sia sotto l'aspetto "quantitativo" che "qualitativo" la mutagenicità dei suoli non rispecchia quella del PM. Il suolo è una matrice ambientale complessa che può venir contaminata da diverse sorgenti inquinanti. Il suolo può venir considerato inoltre come "memoria storica" delle contaminazioni avvenute in tempi diversi. Le possibili fonti confondenti presenti in una determinata area non sempre sono di

facile identificazione, una corretta analisi sul territorio è necessaria per una corretta lettura dei dati.

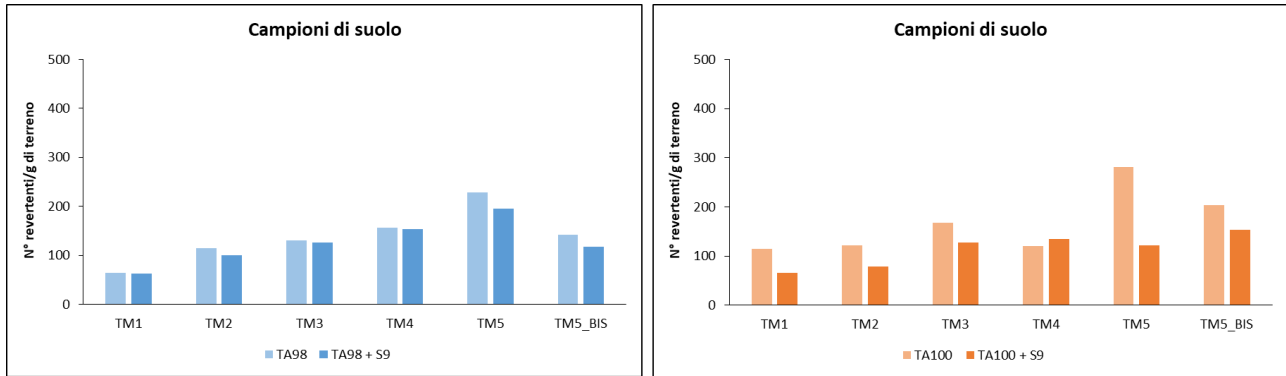


Figura 6 - Revertenti indotti per grammo di terreno (in peso secco), nei ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium*, in presenza (+S9) e in assenza di attivazione metabolica esogena, calcolati per i campioni positivi (rapporto trattato/controllo ≥ 2) e per quelli che presentano rette di regressione con $R^2 \geq 0.70$

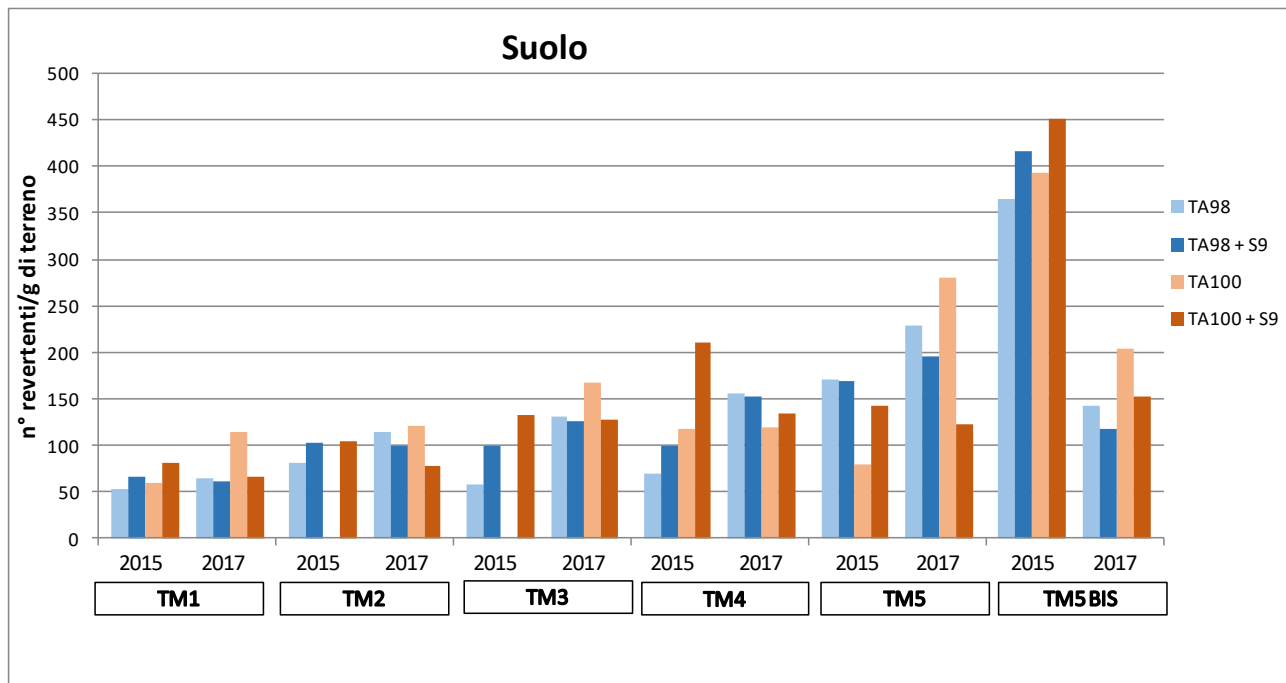


Figura 7 - Confronto relativo alla mutagenicità, espressa come numero di revertenti/g di terreno, rilevata nelle campagne di monitoraggio 2015 e 2017. Vengono riportati i dati ottenuti sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* con e senza attivazione metabolica esogena (+S9).



La valutazione comparativa della mutagenicità dei suoli prelevati nelle campagne di monitoraggio 2015 e 2017 (Fig. 7), evidenzia una sostanziale omogeneità dei dati. L'analisi comparativa svolta mediante test non parametrico per campioni correlati (test dei ranghi di Wilcoxon), in generale, non evidenzia differenze statisticamente significative nei test condotti con i due ceppi senza attivazione metabolica. Per quanto riguarda i test con attivazione metabolica risulta significativa solo la comparazione tra analisi condotte nei due anni con il ceppo TA100 con attivazione metabolica ($p < 0.05$). Si rileva in particolare un sostanziale miglioramento nel terreno TM5_BIS (test dei ranghi con segno di Wilcoxon $p = 0.068$).

Test della Cometa

Il trattamento delle cellule umane con i campioni di suolo ha dato origine a blandi incrementi di migrazione del DNA (Tab. 5, Fig. 8), che sono risultati statisticamente significativi (test ANOVA, posthoc di Bonferroni) per il campione, TM3 (TI%, $p = 0.07$; SCORE, $p < 0.01$) prelevato in zona di ricaduta e per i campioni TM4 (TI%, $p < 0.01$; SCORE $p < 0.001$) e TM5_BIS (TI%, $p < 0.05$; SCORE, $p < 0.01$) prelevati in zona di controllo. Tutti gli altri campioni hanno mostrato livelli di genotossicità non significativi e tra loro rapportabili. E' da rilevare che tutti i campioni, tranne TM 5, hanno indotto effetti citotossici rilevabili dall'aumento di cellule con DNA completamente frammentato, "hedehogs" (Fig. 8 E).

Tabella 5 – Danno al DNA, espresso sia come percentuale d'intensità di fluorescenza (TI%) che come SCORE, indotto per grammo di terreno (in peso secco), in leucociti umani, calcolato per i campioni positivi e per quelli che presentano rette di regressione con $R^2 \geq 0.70$.

Sito di campionamento	TI%/g	score/g
TM1	5	81
TM2	6	81
TM3	10	188
TM4	51	324
TM5	6	46
TM5 BIS	7	114

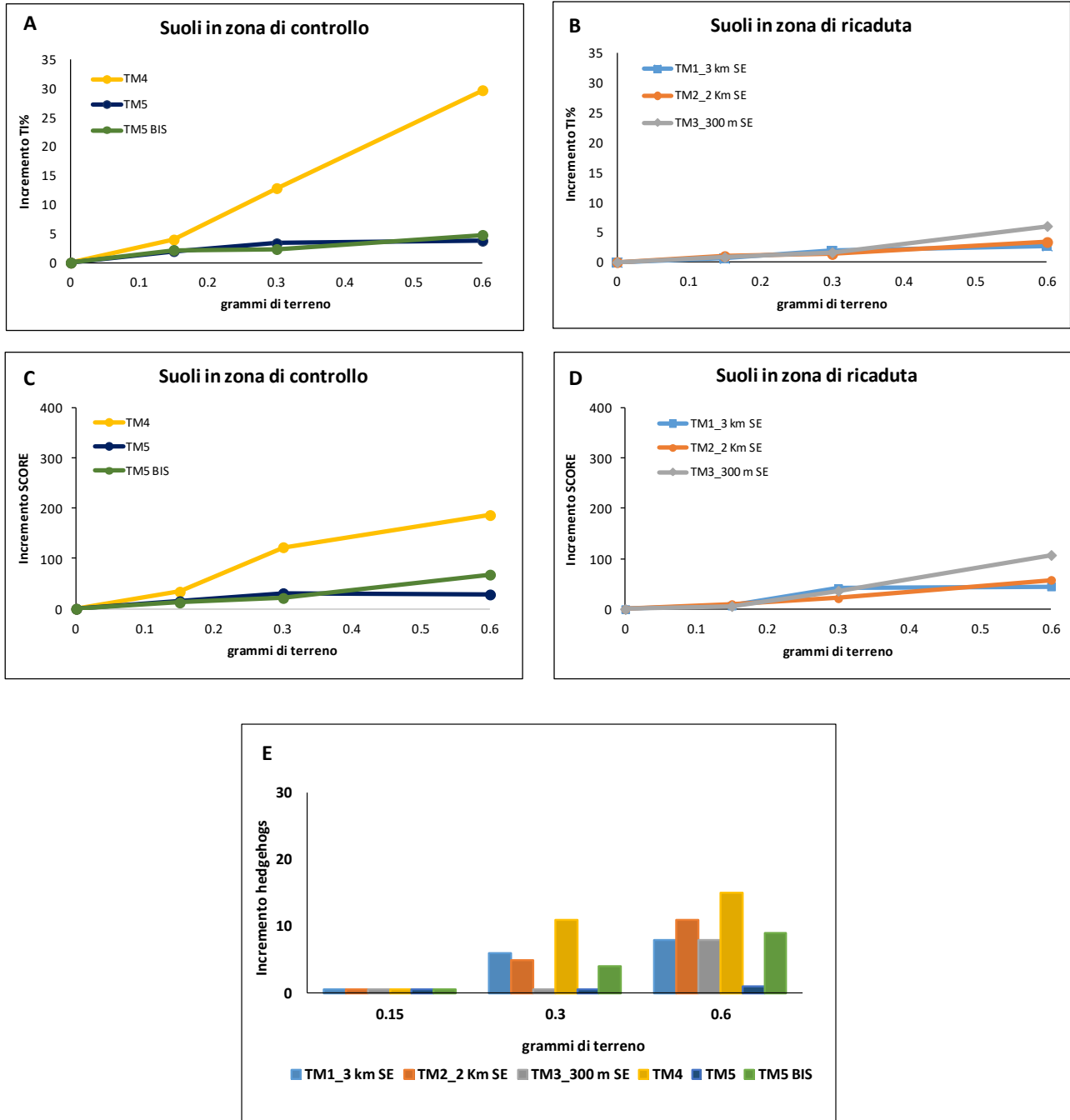


Figura 8 – Incremento di danno al DNA rilevato tramite la percentuale di fluorescenza nella coda della cometa (TI%) calcolata con sistema computerizzato di analisi dell’immagine (A,B) e analisi visuale dell’immagine – SCORE (C,D) e incremento della percentuale di cellule “hedgehogs” (porcospino) (E), in leucociti umani trattati con estratti di terreno prelevato nei siti indicati.



L'analisi statistica comparata delle 2 campagne di campionamento (2015-2017) mediante test dei ranghi di Wilcoxon per campioni correlati non ha restituito alcuna significatività.

Si può comunque rilevare una generale diminuzione di effetti genotossici, tranne che per il campione TM4, in area di controllo ma soggetto a fonti potenzialmente confondenti, che presenta un forte peggioramento (Fig. 9). Il campione TM3, in area di ricaduta, presenta un lieve peggioramento.

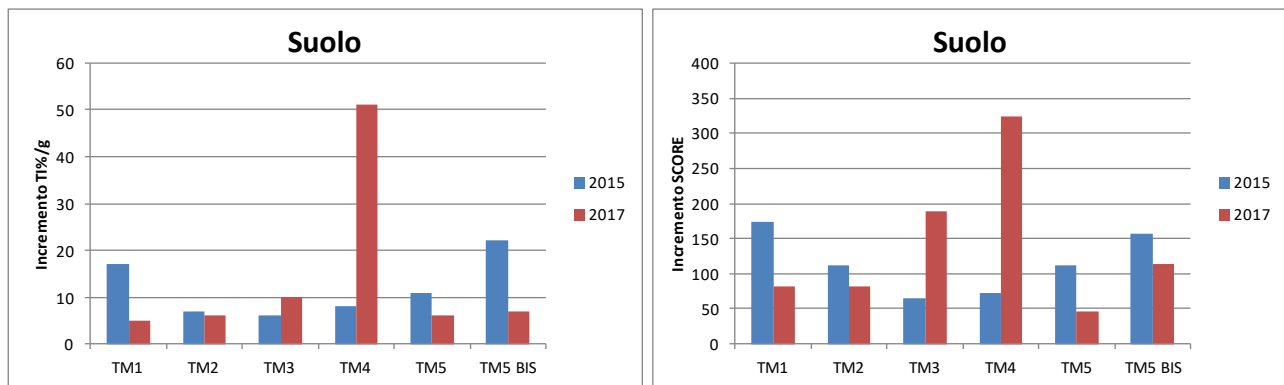


Figura 9 - Confronto relativo alla genotossicità, espressa come incremento di TI%/g di terreno (A) e incremento di SCORE/g di terreno, rilevata nelle campagne di monitoraggio 2015 e 2017.



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

Conclusioni

La valutazione della genotossicità della matrice aria (PM_{2,5}) e della matrice suolo mediante l'utilizzo di test di mutagenesi, in grado di rilevare la presenza di molecole con meccanismo di azione diverso (test di reversione batterica e test della Cometa), ha confermato i dati rilevati nella campagna di monitoraggio precedente (2015). Si osserva una contaminazione generalizzata da sostanze genotossiche, maggiormente evidente nei suoli.

Per quanto riguarda l'analisi della mutagenicità del particolato atmosferico, condotta mediante test di reversione batterica (test di Ames), si osserva una presenza preponderante di molecole ad attività diretta sul DNA. Le differenze quali/quantitative possono venir spiegate da molti fattori. In particolare, la mutagenicità è da imputarsi alle emissioni di vario tipo presenti in zona e alle condizioni meteorologiche che nell'inverno 2016/17 hanno determinato nella valle del Po concentrazioni di polveri sottili molto al di sopra delle medie annuali. E' però da evidenziare una diminuzione del carico mutageno relativo al PM_{2,5} in tutti i campioni analizzati, rispetto ai dati rilevati nel 2015.

Per quanto riguarda la capacità dei campioni di indurre alterazioni alla struttura del DNA, evidenziata con il test della Cometa su leucociti umani, i risultati osservati sono del tutto sovrapponibili a quelli riportati nel campionamento 2015. Tutti i campioni prelevati in zona di ricaduta hanno evidenziato un incremento della genotossicità, che risulta più elevato nel punto di ricaduta più distante dal sito di interesse (CA1) rispetto ai punti di ricaduta più vicini. Tra i PM prelevati nei siti di controllo, solo il campione CA4 sembra possedere una lieve genotossicità.

Nei campioni di suolo si rileva la presenza sia di molecole ad azione diretta sia di pro-mutageni

Per quanto riguarda i campioni di terreno, i TM1, TM2 e TM3, prelevati in zona di ricaduta sono risultati meno mutageni con i test su Salmonella, dei campioni TM4, TM5 e TM5_BIS, prelevati nelle zone di "controllo", confermando che sia sotto l'aspetto "quantitativo" che "qualitativo" la mutagenicità dei suoli non rispecchia quella del PM.

Nell'analisi dei suoli, occorre tenere in considerazione la probabile presenza, in questa matrice, di sostanze genotossiche usate in agricoltura o già presenti in natura, non di origine antropica, che si ritrovano in scarsa o nulla presenza in atmosfera. È necessario inoltre considerare la possibilità che i medesimi contaminanti possano subire processi di trasformazione differenti nelle due matrici analizzate, dando origine a molecole con attività biologica differente.

Per quanto riguarda la risposta dei campioni di suolo al test della Cometa, la maggiore genotossicità è associata al terreno TM4. I campioni derivanti da aree in zona di ricaduta, TM3, o in zona di controllo TM5_BIS hanno anch'essi mostrato una blanda genotossicità. I campioni TM1



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

e il TM2, prelevati nelle zone di ricaduta dell'inceneritore, non hanno presentato una significativa attività genotossica.

L'immagine fornita dall'insieme dei dati raccolti in questa relazione è in generale comparabile con quella rilevata nella campagna 2015.

La Responsabile del Laboratorio di Genotossicologia Umana, Microbica e Vegetale

Prof.ssa Annamaria Buschini

- Allegati: 1: cartina dell'area indagata con indicati i punti di campionamento;
2: foglio di accompagnamento ai campioni di particolato atmosferico prodotto da Studio Alfa (Reggio Emilia);
3: relazione relativa all'estrazione dei campioni stilata dal responsabile del Laboratorio di Chimica Bio-inorganica del Dipartimento SCVSA;
4: 12 rapporti di prova con l'esito dei test di mutagenesi effettuati sui campioni sopra descritti con i ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium*, in presenza e in assenza di attivazione esogena, e con il Comet assay.

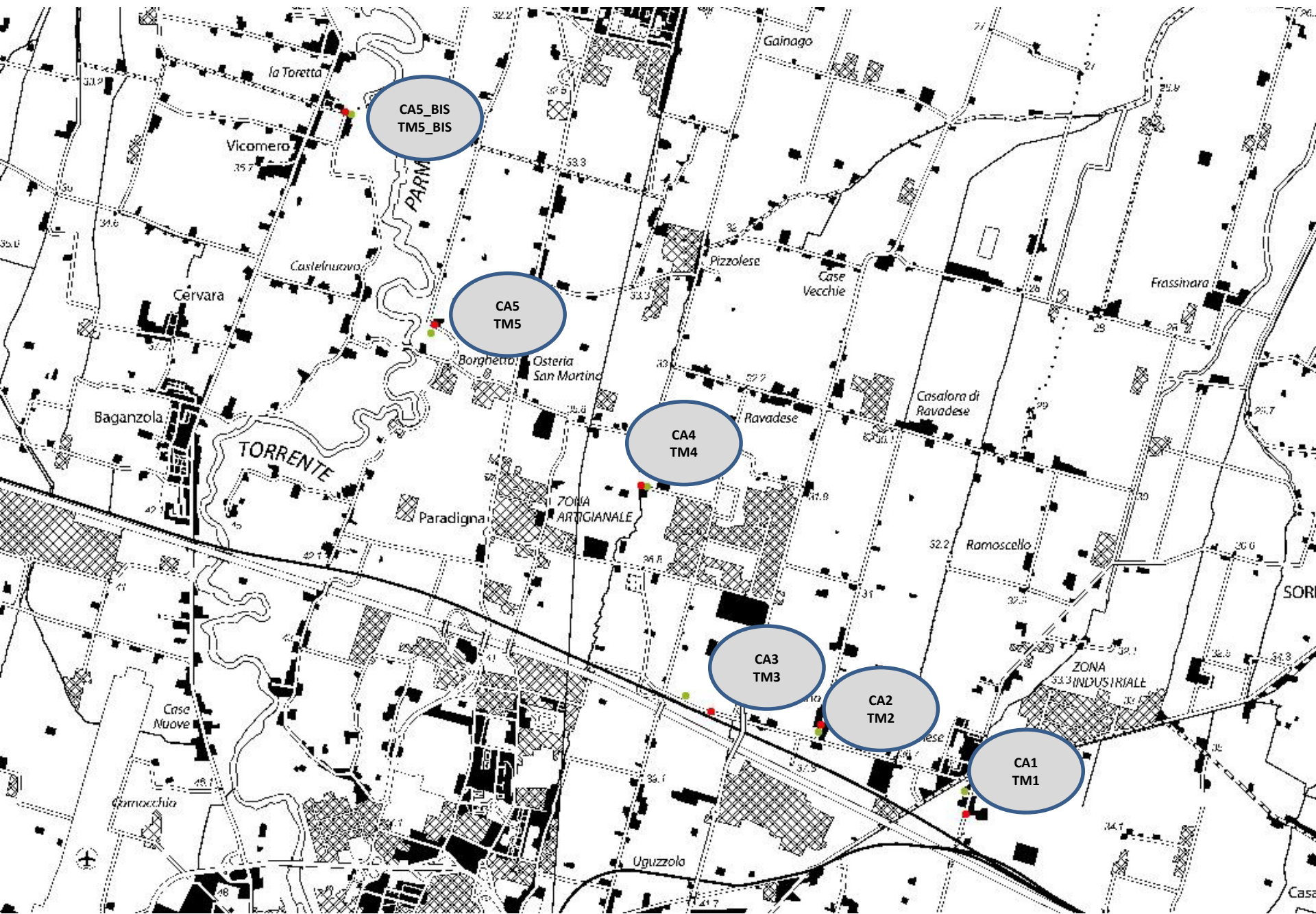


**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE**

ALLEGATO 1

Cartina del sito



CA5_BIS
TM5_BIS

CA5
TM5

CA4
TM4

CA3
TM3

CA2
TM2

CA1
TM1



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE**

ALLEGATO 2

**Foglio di accompagnamento ai campioni di particolato
(Studio Alfa)**



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE**

ALLEGATO 3

Relazione estrazione campioni
(Laboratorio di Chimica Bio-inorganica)



Relazione sulla estrazione chimica dei filtri con particolato atmosferico da sottoporre ai test di mutagenesi

I sei (6) set di filtri destinati alla estrazione chimica sono identificati con le etichette CA1, CA2, CA3, CA4, CA5 e CA5BIS. Ogni set è costituito da due subset come da tabella sotto riportata:

Set	CA1	CA2	CA3	CA4	CA5	CA5BIS
Subset	M1580	M1575	M1564	M1573	M1563	M1568
	M1579	M1577	M1578	M1569	M1567	M1570

La vetreria utilizzata per lo scopo è stata lavata, risciacquata con acqua distillata, asciugata in stufa. Dopo un ulteriore lavaggio con acido nitrico diluito in acqua distillata, è stata risciacquata abbondantemente con acqua distillata ed infine asciugata in stufa.

Nella procedura di estrazione è stato utilizzato un sistema di estrazione Büchi B-811, 230 V/50-60 Hz, completo di 4 refrigeranti, 4 colonne di estrazione, bicchieri per solventi e portaditali. In tutte le estrazioni è stata utilizzata vetreria dedicata e ditali in cellulosa nuovi. Il prodotto dell'estrazione è stato inviato al laboratorio di mutagenesi in flaconi in vetro con tappo a vite.

Per ciascun set, tutti i filtri sono stati inseriti in un ditale per estrazione in cellulosa. Il ditale è stato poi posto nel corpo centrale dell'estrattore Soxhlet. L'estrazione è stata condotta utilizzando 150 ml di acetone RS per pesticidi per almeno 100 cicli. Alla fine dell'estrazione il solvente con l'estratto è stato trasferito in un pallone da evaporatore rotante. La soluzione è stata così ridotta a pochi millilitri ed è stata trasferita in una vial di vetro. Il pallone è stato risciacquato con alcuni ml di acetone e i lavaggi sono stati uniti all'estratto. I sei campioni sono poi stati portati a secco sotto cappa.

Relazione sulla estrazione chimica di suolo da sottoporre ai test di mutagenesi

Sono pervenuti al laboratorio di Chimica Bioinorganica del Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale sei (6) campioni di terreno identificati con le etichette TM1, TM2, TM3, TM4, TM5 e TM5_BIS destinati alla determinazione del residuo secco e al trattamento di estrazione. I campioni avevano già subito un processo di sminuzzamento e di pulitura da sassi, residui vegetali, insetti ed altre parti macroscopiche estranee. La vetreria utilizzata per lo scopo è stata lavata, risciacquata con acqua distillata, asciugata in stufa. Dopo un ulteriore lavaggio con acido nitrico diluito in acqua distillata, è stata risciacquata



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

abbondantemente con acqua distillata ed infine asciugata in stufa.

Nella procedura preliminare di determinazione peso secco del campione sono state usate capsule di porcellana ed una stufa termostata e predisposta per mantenere la temperatura a +105°C.

Nella successiva procedura di estrazione è stato invece utilizzato un sistema di estrazione Büchi B-811, 230 V/50-60 Hz, completo di 4 refrigeranti, 4 colonne di estrazione, bicchieri per solventi e portaditali. In tutte le procedure è stata utilizzata vetreria dedicata. In particolare, sono stati utilizzati per ogni estrazione ditali in cellulosa nuovi. Il prodotto dell'estrazione è stato inviato al laboratorio di mutagenesi in flaconi in vetro con tappo a vite.

Determinazione del peso secco

Un aliquota accuratamente pesata di circa 10 g di ciascun campione è stata posta in una ciotola di porcellana e messa in stufa a 105°C per 24 ore (DM 11 maggio 1992). Dopo tale trattamento si è provveduto a pesare di nuovo il campione e se ne è determinato il peso secco come da tabella sotto riportata.

Nome	Pesata (g)	Peso secco (g)
TM1	10.518	10.357
TM2	10.807	10.655
TM3	10.342	10.177
TM4	10.022	9.875
TM5	10.300	10.062
TM5_BIS	10.567	10.425

Nome	Tara capsula (g)	Campioni		Dopo trattamento in stufa		Differenza (g)	Umidità %
		Lordo (g)	Pesata (g)	Lordo (g)	Peso secco (g)		
TM1	56.891	67.409	10.518	67.248	10.357	0.161	1.53
TM2	87.726	98.533	10.807	98.381	10.655	0.152	1.41
TM3	47.335	57.677	10.342	57.512	10.177	0.165	1.60
TM4	56.891	66.913	10.022	66.766	9.875	0.147	1.47
TM5	87.726	98.026	10.300	97.788	10.062	0.238	2.31
TM5_BIS	56.891	67.458	10.567	67.316	10.425	0.142	1.34

Estrazione chimica dei suoli

Un'aliquota di terreno accuratamente pesata di circa 100g (vedi tabella sotto riportata) è stata suddivisa in due aliquote di circa 50g e queste sono state poste in due ditali di cellulosa. Questi sono stati quindi inseriti

Parco Area delle Scienze 11/A, Campus • I-43124 Parma

Tel 0521 905631

Sito internet: <http://scvsa.unipr.it/it>

PEC DipScienzeCVSA@pec.unipr.it

Codice Fiscale e Partita IVA 00308780345



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

nell'apposito alloggiamento dell'estrattore Soxhlet.

Campioni	Pesata	1° aliquota	2° aliquota
TM1	100.619	50.615	50.004
TM2	100.239	50.137	50.102
TM3	100.225	50.095	50.130
TM4	100.541	50.352	50.189
TM5	100.246	50.011	50.235
TM5_BIS	100.901	50.152	50.749

L'estrazione è stata condotta utilizzando 150 ml di una miscela 1/1 di acetone RS per pesticidi/esano (Linea Guida APAT: RTI CTN_SSC 2/2002). Sono stati effettuati almeno 100 cicli di estrazione. Alla fine dell'estrazione il solvente con l'estratto è stato trasferito in un pallone da evaporatore rotante ed è stato fatto evaporare il solvente fino a ridurlo a pochi ml. Questi sono stati trasferiti in vial di vetro, il pallone è stato risciacquato più volte con alcuni ml della miscela acetone/esano usato come solvente. La soluzione ottenuta è stata unita all'estratto e quindi portato a secco sotto flusso di azoto.

I campioni sono stati quindi inviati al laboratorio della prof Buschini per l'esecuzione dei test di mutagenesi.

Prof. Giorgio Pelosi

(Laboratorio di Chimica Bioinorganica)



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE**

ALLEGATO 4

Rapporti di prova



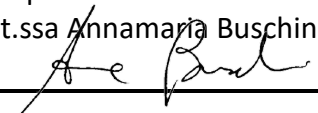
UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

RAPPORTO DI PROVA N°1 del 19/12/17

Dati Anagrafici	
Campione di:	FILTRI PM 2.5
Prelevatore:	StudioALFA
Data prelievo:	13-20/02/2017
Punto Prelievo:	CA1
Comune di Prelievo:	Parma
Cliente:	IREN AMBIENTE S.P.A.
Indirizzo Cliente:	STRADA BORGOFORTE, 22/A- PIACENZA (PC)
Quesito:	ANALISI DI GENOTOSSICITA'
Modalità Campionamento:	A cura del Prelevatore

Accettazione a cura dello Sportello di:	
Data Ricevimento:	Fine campionamento
Temperatura Ricevimento:	Ambiente

RISULTATO DELLA PROVA		
Parametro	Valore*	U. di M.
<i>Metodo di riferimento</i>		
Revertenti indotti nel ceppo TA98-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	4.9	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA98+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	2.3	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	1.5	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	1.2	Trattato/Controllo
Percentuale di intensità di fluorescenza – T1% <i>Test della Cometa su leucociti umani</i>	2.1	% Int. fluorescenza
<p>Il responsabile delle Analisi Dott.ssa Annamaria Buschini</p> 		

*i valori riportati sono relativi ai trattamenti con le concentrazioni massime saggiate.




UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

RAPPORTO DI PROVA N°2 del 19/12/17

Dati Anagrafici	
Campione di:	FILTRI PM 2.5
Prelevatore:	StudioALFA
Data prelievo:	27/02-06/03/2017
Campione Formale:	CA2
Punto Prelievo:	Parma
Comune di Prelievo:	IREN AMBIENTE S.P.A.
Cliente:	STRADA BORGOFORTE, 22/A-
Indirizzo Cliente:	PIACENZA (PC)
Quesito:	ANALISI DI GENOTOSSICITA'
Modalità Campionamento:	A cura del Prelevatore

Accettazione a cura dello Sportello di:	
Data Ricevimento:	Fine campionamento
Temperatura Ricevimento:	Ambiente

RISULTATO DELLA PROVA		
Parametro	Valore*	U. di M.
<i>Metodo di riferimento</i>		
Revertenti indotti nel ceppo TA98-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	5.4	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA98+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	1.9	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	1.2	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	1.4	Trattato/Controllo
Percentuale di intensità di fluorescenza – T1% <i>Test della Cometa su leucociti umani</i>	7.9	% int. fluorescenza
<p>Il responsabile delle Analisi Dott.ssa Annamaria Buschini</p> 		

*i valori riportati sono relativi ai trattamenti con le concentrazioni massime saggiate.



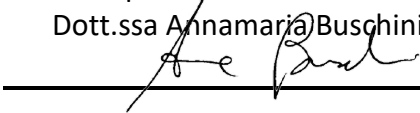
UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

RAPPORTO DI PROVA N°3 del 19/12/17

Dati Anagrafici	
Campione di:	FILTRI PM 2.5
Prelevatore:	StudioALFA
Data prelievo:	20-27/02/2017
Campione Formale:	CA3
Punto Prelievo:	Parma
Comune di Prelievo:	IREN AMBIENTE S.P.A.
Cliente:	STRADA BORGOFORTE, 22/A-
Indirizzo Cliente:	PIACENZA (PC)
Quesito:	ANALISI DI GENOTOSSICITA'
Modalità Campionamento:	A cura del Prelevatore

Accettazione a cura dello Sportello di:	
Data Ricevimento:	Fine campionamento
Temperatura Ricevimento:	Ambiente

RISULTATO DELLA PROVA		
Parametro	Valore*	U. di M.
<i>Metodo di riferimento</i>		
Revertenti indotti nel ceppo TA98-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	11.1	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA98+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	3.2	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	1.9	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	1.8	Trattato/Controllo
Percentuale di intensità di fluorescenza – T1% <i>Test della Cometa su leucociti umani</i>	5.5	% int. fluorescenza
<p>Il responsabile delle Analisi Dott.ssa Annamaria Buschini</p> 		

*i valori riportati sono relativi ai trattamenti con le concentrazioni massime saggiate.



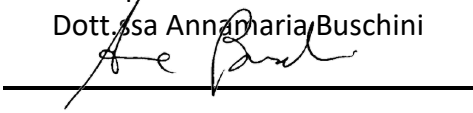
UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

RAPPORTO DI PROVA N°4 del 19/12/17

Dati Anagrafici	
Campione di:	FILTRI PM 2.5
Prelevatore:	StudioALFA
Data prelievo:	13-20/03/2017
Campione Formale:	CA4
Punto Prelievo:	Parma
Comune di Prelievo:	IREN AMBIENTE S.P.A.
Cliente:	STRADA BORGOFORTE, 22/A-
Indirizzo Cliente:	PIACENZA (PC)
Quesito:	ANALISI DI GENOTOSSICITA'
Modalità Campionamento:	A cura del Prelevatore

Accettazione a cura dello Sportello di:	
Data Ricevimento:	Fine campionamento
Temperatura Ricevimento:	Ambiente

RISULTATO DELLA PROVA		
Parametro	Valore*	U. di M.
<i>Metodo di riferimento</i>		
Revertenti indotti nel ceppo TA98-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	6.5	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA98+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	2.3	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	1.4	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	1.2	Trattato/Controllo
Percentuale di intensità di fluorescenza – T1% <i>Test della Cometa su leucociti umani</i>	4.5	% int. fluorescenza
<p>Il responsabile delle Analisi Dott.ssa Annamaria Buschini</p> 		

*i valori riportati sono relativi ai trattamenti con le concentrazioni massime saggiate.



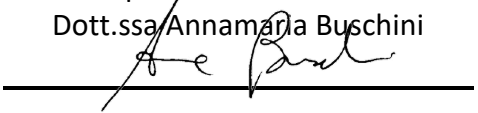
UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

RAPPORTO DI PROVA N°5 del 19/12/17

Dati Anagrafici	
Campione di:	FILTRI PM 2.5
Prelevatore:	StudioALFA
Data prelievo:	06-13/03/2017
Campione Formale:	CA5
Punto Prelievo:	Parma
Comune di Prelievo:	IREN AMBIENTE S.P.A.
Cliente:	STRADA BORGOFORTE, 22/A-
Indirizzo Cliente:	PIACENZA (PC)
Quesito:	ANALISI DI GENOTOSSICITA'
Modalità Campionamento:	A cura del Prelevatore

Accettazione a cura dello Sportello di:	
Data Ricevimento:	Fine campionamento
Temperatura Ricevimento:	Ambiente

RISULTATO DELLA PROVA		
Parametro	Valore*	U. di M.
<i>Metodo di riferimento</i>		
Revertenti indotti nel ceppo TA98-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	3.4	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA98+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	2.5	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	1.3	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	1.3	Trattato/Controllo
Percentuale di intensità di fluorescenza – T1% <i>Test della Cometa su leucociti umani</i>	0.3	% int. fluorescenza
<p>Il responsabile delle Analisi Dott.ssa Annamaria Buschini</p> 		

*i valori riportati sono relativi ai trattamenti con le concentrazioni massime saggiate.



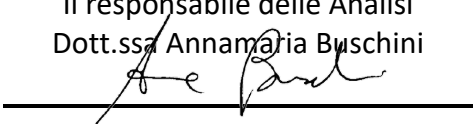
UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

RAPPORTO DI PROVA N°6 del 19/12/17

Dati Anagrafici	
Campione di:	FILTRI PM 2.5
Prelevatore:	StudioALFA
Data prelievo:	20-27/03/2017
Campione Formale:	CA5_BIS
Punto Prelievo:	Parma
Comune di Prelievo:	IREN AMBIENTE S.P.A.
Cliente:	STRADA BORGOFORTE, 22/A-
Indirizzo Cliente:	PIACENZA (PC)
Quesito:	ANALISI DI GENOTOSSICITA'
Modalità Campionamento:	A cura del Prelevatore

Accettazione a cura dello Sportello di:	
Data Ricevimento:	Fine campionamento
Temperatura Ricevimento:	Ambiente

RISULTATO DELLA PROVA		
Parametro	Valore*	U. di M.
<i>Metodo di riferimento</i>		
Revertenti indotti nel ceppo TA98-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	4.9	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA98+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	2.3	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	1.5	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	1.2	Trattato/Controllo
Percentuale di intensità di fluorescenza – T1% <i>Test della Cometa su leucociti umani</i>	2.1	% int. fluorescenza
<p>Il responsabile delle Analisi Dott.ssa Annamaria Buschini</p> 		

*i valori riportati sono relativi ai trattamenti con le concentrazioni massime saggiate.



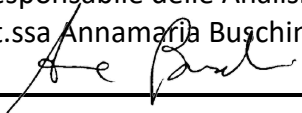
UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

RAPPORTO DI PROVA N°7 del 19/12/17

Dati Anagrafici	
Campione di:	Terreno
Prelevatore:	StudioALFA
Data prelievo:	28/02/2017
Campione Formale:	TM1
Punto Prelievo:	Parma
Comune di Prelievo:	IREN AMBIENTE S.P.A.
Cliente:	STRADA BORGOFORTE, 22/A-
Indirizzo Cliente:	PIACENZA (PC)
Quesito:	ANALISI DI GENOTOSSICITA'
Modalità Campionamento:	A cura del Prelevatore

Accettazione a cura dello Sportello di:	
Data Ricevimento:	28/02/2017
Temperatura Ricevimento:	Ambiente

RISULTATO DELLA PROVA		
Parametro	Valore*	U. di M.
<i>Metodo di riferimento</i>		
Revertenti indotti nel ceppo TA98-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	6.6	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA98+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	7.5	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	2.4	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	1.9	Trattato/Controllo
Percentuale di intensità di fluorescenza – T1% <i>Test della Cometa su leucociti umani</i>	3.1	% int. fluorescenza
<p>Il responsabile delle Analisi Dott.ssa Annamaria Buschini</p> 		

*i valori riportati sono relativi ai trattamenti con le concentrazioni massime saggiate.



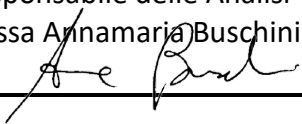
UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

RAPPORTO DI PROVA N°8 del 19/12/17

Dati Anagrafici	
Campione di:	Terreno
Prelevatore:	StudioALFA
Data prelievo:	28/02/2017
Campione Formale:	TM2
Punto Prelievo:	Parma
Comune di Prelievo:	IREN AMBIENTE S.P.A.
Cliente:	STRADA BORGOFORTE, 22/A-
Indirizzo Cliente:	PIACENZA (PC)
Quesito:	ANALISI DI GENOTOSSICITA'
Modalità Campionamento:	A cura del Prelevatore

Accettazione a cura dello Sportello di:	
Data Ricevimento:	28/02/2017
Temperatura Ricevimento:	Ambiente

RISULTATO DELLA PROVA		
Parametro	Valore*	U. di M.
<i>Metodo di riferimento</i>		
Revertenti indotti nel ceppo TA98-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	10.6	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA98+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	11.4	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	2.4	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	2.1	Trattato/Controllo
Percentuale di intensità di fluorescenza – T1% <i>Test della Cometa su leucociti umani</i>	3.7	% int. fluorescenza
<p>Il responsabile delle Analisi Dott.ssa Annamaria Buschini</p> 		

*i valori riportati sono relativi ai trattamenti con le concentrazioni massime saggate.



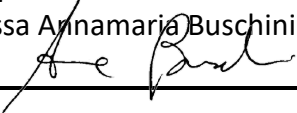
UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

RAPPORTO DI PROVA N°9 del 19/12/17

Dati Anagrafici	
Campione di:	Terreno
Prelevatore:	StudioALFA
Data prelievo:	28/02/2017
Campione Formale:	TM3
Punto Prelievo:	Parma
Comune di Prelievo:	IREN AMBIENTE S.P.A.
Cliente:	STRADA BORGOFORTE, 22/A-
Indirizzo Cliente:	PIACENZA (PC)
Quesito:	ANALISI DI GENOTOSSICITA'
Modalità Campionamento:	A cura del Prelevatore

Accettazione a cura dello Sportello di:	
Data Ricevimento:	28/02/2017
Temperatura Ricevimento:	Ambiente

RISULTATO DELLA PROVA		
Parametro	Valore*	U. di M.
<i>Metodo di riferimento</i>		
Revertenti indotti nel ceppo TA98-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	12.3	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA98+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	14.3	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	2.9	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	2.8	Trattato/Controllo
Percentuale di intensità di fluorescenza – T1% <i>Test della Cometa su leucociti umani</i>	6.4	% int. fluorescenza
<p>Il responsabile delle Analisi Dott.ssa Annamaria Buschini</p> 		

*i valori riportati sono relativi ai trattamenti con le concentrazioni massime saggiate.



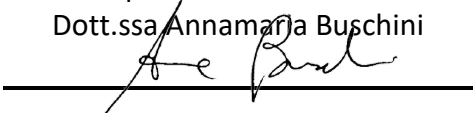
UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

RAPPORTO DI PROVA N°10 del 19/12/17

Dati Anagrafici	
Campione di:	Terreno
Prelevatore:	StudioALFA
Data prelievo:	28/02/2017
Campione Formale:	TM4
Punto Prelievo:	Parma
Comune di Prelievo:	IREN AMBIENTE S.P.A.
Cliente:	STRADA BORGOFORTE, 22/A-
Indirizzo Cliente:	PIACENZA (PC)
Quesito:	ANALISI DI GENOTOSSICITA'
Modalità Campionamento:	A cura del Prelevatore

Accettazione a cura dello Sportello di:	
Data Ricevimento:	28/02/2017
Temperatura Ricevimento:	Ambiente

RISULTATO DELLA PROVA		
Parametro	Valore*	U. di M.
<i>Metodo di riferimento</i>		
Revertenti indotti nel ceppo TA98-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	19.2	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA98+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	19.5	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	3.5	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	2.9	Trattato/Controllo
Percentuale di intensità di fluorescenza – T1% <i>Test della Cometa su leucociti umani</i>	32.1	% int. fluorescenza
<p>Il responsabile delle Analisi Dott.ssa Annamaria Buschini</p> 		

*i valori riportati sono relativi ai trattamenti con le concentrazioni massime saggiate.



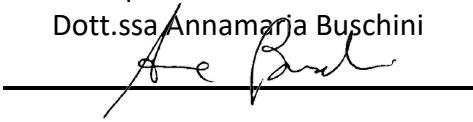
UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

RAPPORTO DI PROVA N°11 del 19/12/17

Dati Anagrafici	
Campione di:	Terreno
Prelevatore:	StudioALFA
Data prelievo:	28/02/2017
Campione Formale:	TM5
Punto Prelievo:	Parma
Comune di Prelievo:	IREN AMBIENTE S.P.A.
Cliente:	STRADA BORGOFORTE, 22/A-
Indirizzo Cliente:	PIACENZA (PC)
Quesito:	ANALISI DI GENOTOSSICITA'
Modalità Campionamento:	A cura del Prelevatore

Accettazione a cura dello Sportello di:	
Data Ricevimento:	28/02/2017
Temperatura Ricevimento:	Ambiente

RISULTATO DELLA PROVA		
Parametro	Valore*	U. di M.
<i>Metodo di riferimento</i>		
Revertenti indotti nel ceppo TA98-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	27.2	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA98+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	29.7	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	5.0	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	2.7	Trattato/Controllo
Percentuale di intensità di fluorescenza – T1% <i>Test della Cometa su leucociti umani</i>	6.2	% int. fluorescenza
<p>Il responsabile delle Analisi Dott.ssa Annamaria Buschini</p> 		

*i valori riportati sono relativi ai trattamenti con le concentrazioni massime saggiate.



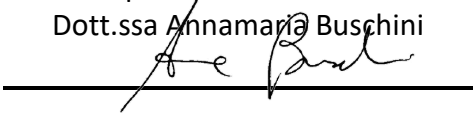
UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
CHIMICHE, DELLA VITA E DELLA
SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

RAPPORTO DI PROVA N°12 del 19/12/17

Dati Anagrafici	
Campione di:	Terreno
Prelevatore:	StudioALFA
Data prelievo:	28/02/2017
Campione Formale:	TM5_BIS
Punto Prelievo:	Parma
Comune di Prelievo:	IREN AMBIENTE S.P.A.
Cliente:	STRADA BORGOFORTE, 22/A-
Indirizzo Cliente:	PIACENZA (PC)
Quesito:	ANALISI DI GENOTOSSICITA'
Modalità Campionamento:	A cura del Prelevatore

Accettazione a cura dello Sportello di:	
Data Ricevimento:	28/02/2017
Temperatura Ricevimento:	Ambiente

RISULTATO DELLA PROVA		
Parametro	Valore*	U. di M.
<i>Metodo di riferimento</i>		
Revertenti indotti nel ceppo TA98-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	17.8	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA98+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	18.4	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100-S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	4.1	Trattato/Controllo
Revertenti indotti nel ceppo TA100+S9 <i>Test di reversione batterica su Salmonella su matrici ambientali</i>	3.1	Trattato/Controllo
Percentuale di intensità di fluorescenza – T1% <i>Test della Cometa su leucociti umani</i>	7.2	% int. fluorescenza
<p>Il responsabile delle Analisi Dott.ssa Annamaria Buschini</p> 		

*i valori riportati sono relativi ai trattamenti con le concentrazioni massime saggiate.