



biologia applicata all'ambiente

Rif. 0517C /23

Torino, 26 maggio 2023

Spett.le **Hystrix S.r.l.**
Via Castelfidardo, 7
61032 Fano (PU)

OGGETTO: Caratterizzazione biologica mediante test di mutagenesi di matrici ambientali (campioni di terreno) – monitoraggio fase ante operam

In riferimento alla vs. richiesta di analisi, inviamo i risultati delle valutazioni analitiche svolte su n. 5 campioni di terreno da Voi prelevati.

Cordiali saluti

ecoBIOQUAL s.r.l.

Dr.ssa Sara BENEVENTI

Redazione a cura di: dr.ssa Valeria Meineri – ecobioqual s.r.l.

1. PREMESSA

Convenzionalmente il controllo della presenza degli inquinanti nell'ambiente si avvale di valutazioni chimico-fisiche monoparametriche, che prese singolarmente non possono darci una concreta valutazione di come e quanto un insieme di inquinanti possa modificare una matrice biologica sia essa animale o vegetale. Inoltre, le leggi vigenti in materia ambientale hanno definito, per una lunga lista di inquinanti, limiti a salvaguardia dell'ambiente e della salute umana riferiti unicamente all'esposizione diretta, per concentrazione e tempo, all'inquinante stesso senza peraltro tener presente la complessità dell'ecosistema di cui l'uomo è partecipe.

In ambito analitico-preventivo, uno strumento di particolare sensibilità ed efficacia è rappresentato dai metodi biologici (basati su organismi viventi) che consentono di valutare gli effetti correlati con le diverse sostanze presenti e/o adsorbite alle matrici ambientali e, quindi, evidenziare i potenziali effetti indotti sulla salute dalle interazioni tra le stesse.

A questo proposito, il presente documento rappresenta il rapporto delle attività effettuate nell'ambito di una campagna per la caratterizzazione biologica mediante test di mutagenesi di matrici ambientali rappresentate da acqua di falda.

2. DISEGNO SPERIMENTALE

2.1 Scopo dello studio

Scopo dello studio è stata la valutazione dell'eventuale risposta biologica (intesa come attività mutagenica) di campioni di acqua di falda secondo quanto previsto dal metodo OECD 471:2020 "Bacterial Reverse Mutation Test"

2.2 Campioni in esame

Di seguito vengono riportate le specifiche dei campioni analizzati:

Cliente	Hystrix S.r.l.
indirizzo	Via Castelfidardo 7 – 61032 Fano (PU)
Tipologia campione (matrice)	Terreno
ID campione cliente	SUO-01AP SUO-02AP SUO-03AP SUO-04AP SUO-05AP
Data e luogo di prelievo	Non comunicato dal Cliente
Data di ricevimento in laboratorio	05/05/2023/2023
Data di emissione del rapporto di prova	26/05/2023

2.3 Analisi biologiche: test di mutagenesi (Salmonella/microsome Assay)

Il test di Ames rappresenta uno dei test di mutagenesi più utilizzati da almeno mezzo secolo per gli studi di mutagenesi ambientale eseguiti su campioni di farmaci, sostanze chimiche e campioni ambientali mediante l'uso di ceppi mutanti di *Salmonella typhimurium* ed *Escherichia coli*.

I principali motivi che ne giustificano l'utilizzo sono la relativa semplicità e rapidità di esecuzione ed il discreto valore predittivo nei confronti della potenziale cancerogenicità di singoli composti o di miscele complesse.

Il test di reversione con *Salmonella typhimurium* è stato proposto per la prima volta nel 1966 da Bruce Ames e H.J. Whitfield (1, 2). Essi dimostrarono che una serie di mutanti per l'amminoacido istidina era in grado di subire reversione a seguito del trattamento con diverse classi di composti chimici.

Da allora il test si è evoluto e perfezionato notevolmente perseguendo tre obiettivi fondamentali:

- Ottenere, attraverso la selezione e la modificazione genetica, una maggiore sensibilità dei ceppi impiegati
- Ampliare il numero delle classi di composti mutageni identificabili grazie all'introduzione del sistema di attivazione metabolica di mammifero
- Sviluppare dei protocolli sperimentali per rendere la metodica rapida, di facile esecuzione, informativa e relativamente poco costosa (l'emissione di Norme tecniche internazionali ISO, OECD, Standard Methods) (3, 4, 5, 6)

Principio del test

Il test di Ames utilizza ceppi di *Salmonella typhimurium* che contengono una mutazione in uno dei geni che costituiscono l'operone per la biosintesi dell'istidina, in modo da renderli auxotrofi per questo amminoacido. I ceppi così modificati non sono in grado di crescere in un terreno privo di questo amminoacido e possono fungere da marker dell'attività mutagena in quanto, se sottoposti ad un agente mutageno, riprendono la loro primitiva funzionalità, crescendo anche quando l'amminoacido non è disponibile.

Il principio sul quale si fonda questo metodo è, perciò, il fenomeno della **retromutazione** dei batteri esposti all'azione di una sostanza mutagena, dalla condizione di auxotrofia a quella di prototrofia per l'istidina (istidina-dipendenza).

Poiché alcuni contaminanti ambientali non sono mutageni diretti ma lo diventano a seguito delle trasformazioni e attivazioni metaboliche che avvengono nell'organismo, al fine di studiare tale effetto genotossico, è previsto durante lo svolgimento del test l'utilizzo di una frazione microsomiale di fegato di ratto (**S9**) che permette di evidenziare quelle sostanze mutagene definite indirette.

Scelta dei ceppi

Le Norme tecniche prevedono la possibilità di utilizzare una batteria di ceppi per valutare la risposta di un campione (es. TA98, TA100, TA1535, TA1537 o TA 97, TA102).

Nel corso del presente lavoro sono stati utilizzati i ceppi TA98 e TA100 che presentano le seguenti caratteristiche: il ceppo **TA 98** evidenzia mutageni con azione di frameshift che provocano lo slittamento del modulo di lettura del codice genetico, mentre il ceppo **TA 100** evidenzia mutageni che provocano una sostituzione di base che inducono una lettura scorretta del codice genetico.

biologia applicata all'ambiente

La scelta di eseguire il test con due ceppi trova fondamento da evidenze di letteratura (7, 8) che riportano che né uno specifico ceppo né tantomeno il numero di ceppi che risultano sensibili a un mutageno è, a priori, garanzia di positività. In generale, a meno di specifiche richieste, uno screening di sostanze può essere inizialmente effettuato con i due ceppi TA 98 e TA100 in presenza e assenza di S9-mix.

Quanto appena riportato trova ulteriore conferma da una recente analisi (2019) eseguita dal gruppo di lavoro costituito nell'ambito dell'International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT) che ha valutato la capacità dei diversi ceppi nel fornire risposte equivalenti nell'identificare le proprietà mutagene di un campione. Tale studio ha riportato che il 93 % delle sostanze mutagene possono essere evidenziate usando esclusivamente i ceppi TA98 e TA100 (8).

I ceppi utilizzati presentano le seguenti caratteristiche genetiche:

SIGLA DEL CEPPO DI <i>Salmonella typhimurium</i>	MUTAZIONE NELL'OPERONE DELL'ISTIDINA	CARATTERI AGGIUNTIVI (MUTAZIONI ACCESSORIE)
TA98	HIS D3052	rfa, uvr-, pmK101
TA100	HISG46	rfa, uvr-, pmK101

HIS D3052 = mutazione di tipo frameshift determinata dalla delezione di una base (citosina) in una tripletta del gene D che codifica per la deidrogenasi. Questa mutazione è utile per rilevare mutageni come ammine aromatiche, idrocarburi policiclici, diazobenzeni.

HIS G46 = sostituzione nucleotidica nel gene G che codifica per la produzione del primo enzima che interviene nella biosintesi dell'istidina. Ciò determina la formazione di un codone "non sense". Il fenotipo selvatico può essere ristabilito per retromutazione vera o per soppressione esterna. Questa mutazione è utile per rilevare mutageni come agenti alchilanti, nitrosammine, epossidi.

rfa = mutazione che provoca una perdita parziale della barriera lipopolisaccaridica sulla superficie della membrana del batterio che ne aumenta la permeabilità alle grosse molecole che normalmente non riuscirebbero ad oltrepassare la parete batterica.

uvrB = è una delezione a livello del gene che codifica per l'endonucleasi da cui dipende il sistema di riparazione prereplicativa. Tale delezione si estende al gene BIO, rendendo i ceppi eterotrofi anche per la Biotina.

pmK101 (R-FACTOR) = plasmide che codifica per un sistema di riparazione molto inaccurato e, quindi, altamente mutagenizzante. Conferisce inoltre la resistenza all'ampicillina.

biologia applicata all'ambiente

Procedura del test

Il test è stato eseguito impiegando capsule Petri contenenti terreno minimo sul quale è stata piastrata un'aliquota di terreno liquido contenente una quantità limitata di istidina e biotina, una sospensione di *Salmonella typhimurium*, il campione da saggiare alle diverse dosi e, nel caso di utilizzo dell'attivazione metabolica, dell'S9 mix al 10%.

Ogni campione è stato saggiato a **dosi** diverse scelte in modo da essere comprese in un intervallo di concentrazioni scalari che copra almeno tre ordini di grandezza, ciascuna verificata in triplicato

Le piastre sono state, quindi, incubate per 48 ore a 37°C.

Al termine del periodo di incubazione, si ottiene una crescita base dei batteri legata alla quantità limitata di istidina presente nel terreno a cui si sovrappongono le colonie di revertenti (istidina-indipendenti).

In particolare, si ha un numero di colonie di revertenti di base costante, diverso per ogni ceppo, dovuto alla retromutazione spontanea dei batteri e si assiste ad un aumento del numero di colonie di revertenti proporzionale alla concentrazione e alla potenzialità mutagena del campione testato.

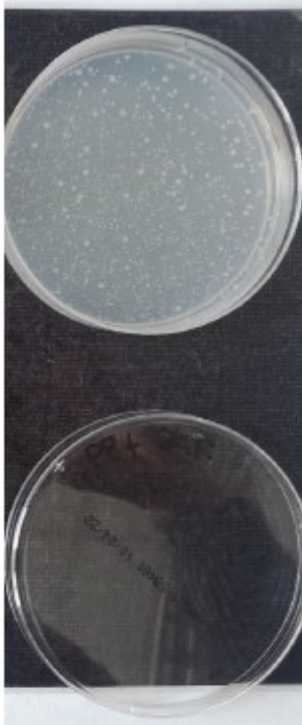
In ogni saggio eseguito con il test di Ames deve essere compiuto un **controllo negativo** (revertenti spontanei) ed un **controllo positivo** con mutageni standard (2-nitrofluorene per il ceppo TA98 –S9, sodio azide per il ceppo TA100 – S9 e 2-aminofluorene per i ceppi TA98 e TA100 +S9) per controllare il funzionamento dei ceppi.

Conteggio e controllo delle piastre, valutazione e interpretazione dei dati

Per ogni campione esaminato:

- a. è stata verificata la presenza/assenza del tappeto di salmonelle di background. La presenza di tale tappeto indica l'assenza di interferenze dovute al campione in esame, come ad esempio fenomeni di citotossicità che possono essere indotte dal campione stesso
- b. è stato contato il numero di colonie revertenti per ciascuna piastra e per ciascuna diluizione.
- c. è stato calcolato il numero dei revertenti corrispondenti ad ogni singola dose eseguendo la media matematica delle 3 prove effettuate
- d. è stato calcolato il rapporto tra numero di revertenti dose/ numero di revertenti controllo

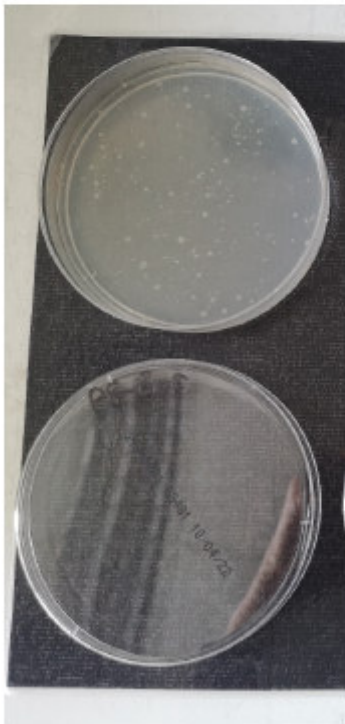
A titolo esemplificativo si riporta un esempio di piastre risultate positive con i mutageni standard usati per ciascun ceppo.



98 +S9 2- Amino fluorene



100 + S9 2-aminofluorene



98 -S9 2-Nitro fluorene



100 – S9 Sodio Azide

Criteri di accettabilità e di valutazione del potenziale mutageno

- Sulla base di quanto riportato nelle Norme Tecniche per stabilire la positività (mutagenicità) dei campioni si applica il criterio del raddoppio, cioè un campione si considera positivo quando in due dosi consecutive, oppure la più alta dose che non ha evidenziato tossicità, il rapporto tra il numero dei revertenti indotti e il numero dei revertenti spontanei (controllo negativo) è ≥ 2 e quando almeno due di queste dosi consecutive hanno mostrato una relazione dose-risposta lineare. (Chu KL, Patel KM, Lin AH, Tarone RE, Linhart MS, Dunkel VC. Evaluating statistical analysis and reproducibility of mutagenicity assay. Mutat Res 1981; 85: 119-132).
- Per l'analisi quantitativa devono essere considerati sia i campioni positivi (rapporto trattato/controllo ≥ 2) che quelli che presentano rette di regressione con $R^2 \geq 0.75$, da cui ricavare i valori dei revertenti/litro, 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.

2.4 Materiali utilizzati

Materiali di riferimento (controlli positivi)

Nome: Sodio Azide (15 $\mu\text{g/ml}$)

Fornitore: Trinova

CAS: 26628-22-8

Nome: 2-Nitro fluorene (20 $\mu\text{g/ml}$)

Fornitore: Trinova

CAS: 607-57-8

Nome: 2-Amino fluorene (100 $\mu\text{g/ml}$)

Fornitore: Trinova

CAS: 153-78-6

Reagenti e mezzi di coltura

Medium	preparazione
E-medium Vogel Bonner	Per un litro: $\text{MgSO}_4 \bullet 7\text{H}_2\text{O}$ 10 g; acido citrico idrato 100g, K_2HPO_4 bibasico anidro 500g, NaH_2PO_4 175g in 670 di acqua. Aspettare che i sali siano tutti ben sciolti e sterilizzare con filtri 0,45 μ
Glucosio 40%	Per un litro: 400 g di D- glucosio sciolti in 1000 ml di acqua MilliQ tiepida a 45°C. Autoclavare a 121° C per 15'
Piastre terreno minimo	Per un litro (sufficiente per 50 piastre): 15 g di Agar (Bacto Agar Difco) e - 930 ml di acqua MilliQ autoclavare per 15' a 121°C e preparare le piastre con aggiunta di VBC e glucosio sotto cappa a flusso laminare. Calcolare il quantitativo di terreno da preparare in funzione del disegno sperimentale (numero di campioni e dosi da testare)
Soft agar	Per 100 ml: 0,6 g di Agar, 0,5 g di NaCl e 100 ml di acqua MilliQ

biologia applicata all'ambiente

Preparato al momento prima di iniziare il test	Autoclavare a 121°C per 15' (vedi punto 5). Calcolare il quantitativo di terreno da preparare in funzione del disegno sperimentale (numero di campioni e dosi da testare)
Soluzione istidina/biotina	Per 100 ml: 12,21 mg di biotina, 10,48 mg di istidina e pPortare a volume con acqua MilliQ. Sterilizzare con filtri 0,22 µ.
Brodi di crescita per i ceppi di salmonella	25 g/l di Nutrient Broth n°2 (Oxoid) in acqua MilliQ (preparazione 25 ml di brodo per ciascun ceppo)
Soluzione di ampicillina 8 mg/ml	Fornitore Trinova
S9 mix (scongelato al momento del test)	Fornitore Trinova (10% Mutazyme)
Ceppi di TA98 e TA100	Fornitore Trinova

Controlli negativi

- Acqua deionizzata sterile
- Dimetilsolfossido DMSO

2.4 Descrizione del disegno sperimentale

Lo studio è stato suddiviso in due parti:

- preparazione dei campioni in esame
- esecuzione del *Salmonella*/microsome assay.

Preparazione dei campioni

L'esecuzione del test di Ames su campioni di terreno ha previsto un trattamento di estrazione al fine di rendere campioni chimicamente complessi, compatibili con le modalità di saggio previste per i test di mutagenesi in vitro (7). Estrazione con solventi organici seguita da concentrazione e scambio-solvente sono tecniche comunemente praticate per concentrare microinquinanti presenti nel campione originale in concentrazioni di ng-µg.

Per l'esecuzione del test di mutagenesi, il campione di terreno è stato estratto mediante soxhlet in diclorometano e successivamente portato a secco. Il residuo secco è stato risospeso in DMSO (dimetilsolfossido), solvente d'elezione per l'esecuzione dei test biologici.

biologia applicata all'ambiente

Le concentrazioni analizzate nel test di mutagenesi sono state le seguenti:

2 g equivalente/piastra
1 g equivalente/piastra
0.5 g equivalenti/piastra
0.2 g equivalenti/piastra
0.1 g equivalenti/piastra
0.02 g equivalenti/piastra

Esecuzione del Salmonella/microsome assay

Come descritto al paragrafo 2.3, in questo studio, in accordo con quanto previsto dal metodo OECD 471:2020, è stato applicato il metodo di incorporazione su piastra che prevede che sospensioni batteriche dei ceppi TA 98 e TA100, preventivamente messe in coltura il giorno antecedente il test, vengano esposte a diverse concentrazioni di ciascun campione in esame, in assenza ed in presenza di un sistema di attivazione metabolica (S9 mix).

Le sospensioni batteriche e le varie dosi di campione, miscelate con una definita quantità di agar, sono piastrate su un terreno minimo.

Dopo 48 h di incubazione a 37°C, il numero di colonie revertenti presenti sulle piastre dei campioni in esame è stato confrontato con il numero di colonie revertenti spontanee del controllo negativo.

3. RISULTATI

Di seguito vengono riportati in forma tabellare i risultati ottenuti.

In ciascun test è stata verificata la presenza delle colonie di background a indicazione dell'assenza di interferenze (es. citotossicità) da parte dei campioni in esame.

Le tabelle seguenti riportano per ciascun campione, come richiesto dal metodo riportato, i valori medi dei revertenti ottenuti nel test considerando le 3 repliche effettuate per ogni diluizione del campione. La tabella, in particolare, riporta la media e la deviazione standard del numero dei revertenti spontanei, di quelli indotti dal mutageno di controllo e dalle dosi saggiate, ed il rapporto tra i revertenti di ciascuna dose rispetto a quelli del controllo.

Campione SUO-01AP

inizio test: 17/05/2023

fine test: 19/05/2023

TA 98 - S9		Background	Medie revertenti ± deviazione standard	Rapporto revertenti dose/ revertenti spontanei
Controllo negativo	Spontanee	normale	16 ± 6	
Controllo positivo	2NF	normale	376 ± 14	24
Dosi del campione	2 g/piastra	normale	51 ± 10	3.26
	1 g/piastra	normale	32 ± 7	2.04
	0.5 g/piastra	normale	29 ± 2	1.85
	0.2 g/piastra	normale	18 ± 2	1.15
	0.1 g/piastra	normale	16 ± 6	1.02
	0.02 g/piastra	normale	13 ± 3	0.85
TA 100 - S9		Background	Medie revertenti ± deviazione standard	Rapporto revertenti dose/ revertenti spontanei
Controllo negativo	Spontanee	normale	117 ± 11	
Controllo positivo	SA	normale	700 ± 20	6
Dosi del campione	2 g/piastra	normale	161 ± 12	1.38
	1 g/piastra	normale	137 ± 11	1.17
	0.5 g/piastra	normale	142 ± 10	1.22
	0.2 g/piastra	normale	108 ± 12	0.92
	0.1 g/piastra	normale	97 ± 10	0.83
	0.02 g/piastra	normale	106 ± 12	0.91
TA 98 + S9		Background	Medie revertenti ± deviazione standard	Rapporto revertenti dose/ revertenti spontanei
Controllo negativo	Spontanee	normale	20 ± 4	
Controllo positivo	2AF	normale	1447 ± 122	71
Dosi del campione	2 g/piastra	normale	86 ± 10	4.23
	1 g/piastra	normale	46 ± 5	2.25
	0.5 g/piastra	normale	38 ± 6	1.85
	0.2 g/piastra	normale	18 ± 2	0.87
	0.1 g/piastra	normale	23 ± 5	1.13
	0.02 g/piastra	normale	15 ± 2	0.72
TA 100 + S9		Background	Medie revertenti ± deviazione standard	Rapporto revertenti dose/ revertenti spontanei
Controllo negativo	Spontanee	normale	153 ± 15	
Controllo positivo	2AF	normale	716 ± 45	5
Dosi del campione	2 g/piastra	normale	255 ± 10	1.66
	1 g/piastra	normale	149 ± 27	0.97
	0.5 g/piastra	normale	146 ± 18	0.95
	0.2 g/piastra	normale	126 ± 6	0.82
	0.1 g/piastra	normale	129 ± 9	0.84
	0.02 g/piastra	normale	121 ± 14	0.79

TA 98 - S9		Background	Medie revertenti ± deviazione standard	Rapporto revertenti dose/ revertenti spontanei
Controllo negativo	Spontanee	normale	16 ± 6	
Controllo positivo	2NF	normale	376 ± 14	24
Dosi del campione	2 g/piastra	normale	33 ± 7	2.13
	1 g/piastra	normale	31 ± 4	2.00
	0.5 g/piastra	normale	26 ± 6	1.68
	0.2 g/piastra	normale	17 ± 3	1.06
	0.1 g/piastra	normale	16 ± 2	1.00
	0.02 g/piastra	normale	13 ± 4	0.85
TA 100 - S9		Background	Medie revertenti ± deviazione standard	Rapporto revertenti dose/ revertenti spontanei
Controllo negativo	Spontanee	normale	117 ± 11	
Controllo positivo	SA	normale	700 ± 20	6
Dosi del campione	2 g/piastra	normale	170 ± 8	1.46
	1 g/piastra	normale	132 ± 10	1.13
	0.5 g/piastra	normale	122 ± 8	1.05
	0.2 g/piastra	normale	116 ± 11	0.99
	0.1 g/piastra	normale	122 ± 6	1.05
	0.02 g/piastra	normale	127 ± 10	1.09
TA 98 + S9		Background	Medie revertenti ± deviazione standard	Rapporto revertenti dose/ revertenti spontanei
Controllo negativo	Spontanee	normale	20 ± 4	
Controllo positivo	2AF	normale	1447 ± 122	71
Dosi del campione	2 g/piastra	normale	37 ± 9	1.80
	1 g/piastra	normale	36 ± 6	1.75
	0.5 g/piastra	normale	33 ± 5	1.64
	0.2 g/piastra	normale	19 ± 2	0.92
	0.1 g/piastra	normale	29 ± 1	1.41
	0.02 g/piastra	normale	19 ± 2	0.92
TA 100 + S9		Background	Medie revertenti ± deviazione standard	Rapporto revertenti dose/ revertenti spontanei
Controllo negativo	Spontanee	normale	153 ± 15	
Controllo positivo	2AF	normale	716 ± 45	5
Dosi del campione	2 g/piastra	normale	146 ± 12	0.95
	1 g/piastra	normale	137 ± 14	0.89
	0.5 g/piastra	normale	134 ± 17	0.87
	0.2 g/piastra	normale	155 ± 11	1.01
	0.1 g/piastra	normale	118 ± 22	0.77
	0.02 g/piastra	normale	125 ± 15	0.82

TA 98 - S9		Background	Medie revertenti ± deviazione standard	Rapporto revertenti dose/ revertenti spontanei
Controllo negativo	Spontanee	normale	16 ± 6	
Controllo positivo	2NF	normale	376 ± 14	24
Dosi del campione	2 g/piastra	normale	30 ± 6	1.91
	1 g/piastra	normale	25 ± 10	1.62
	0.5 g/piastra	normale	20 ± 5	1.30
	0.2 g/piastra	normale	23 ± 2	1.45
	0.1 g/piastra	normale	19 ± 2	1.23
	0.02 g/piastra	normale	11 ± 3	0.72
TA 100 - S9		Background	Medie revertenti ± deviazione standard	Rapporto revertenti dose/ revertenti spontanei
Controllo negativo	Spontanee	normale	117 ± 11	
Controllo positivo	SA	normale	700 ± 20	6
Dosi del campione	2 g/piastra	normale	144 ± 10	1.23
	1 g/piastra	normale	122 ± 12	1.05
	0.5 g/piastra	normale	113 ± 6	0.97
	0.2 g/piastra	normale	115 ± 16	0.98
	0.1 g/piastra	normale	115 ± 11	0.99
	0.02 g/piastra	normale	116 ± 12	1.00
TA 98 + S9		Background	Medie revertenti ± deviazione standard	Rapporto revertenti dose/ revertenti spontanei
Controllo negativo	Spontanee	normale	20 ± 4	
Controllo positivo	2AF	normale	1447 ± 122	71
Dosi del campione	2 g/piastra	normale	28 ± 4	1.39
	1 g/piastra	normale	18 ± 1	0.89
	0.5 g/piastra	normale	20 ± 3	1.00
	0.2 g/piastra	normale	14 ± 1	0.69
	0.1 g/piastra	normale	15 ± 3	0.72
	0.02 g/piastra	normale	18 ± 2	0.90
TA 100 + S9		Background	Medie revertenti ± deviazione standard	Rapporto revertenti dose/ revertenti spontanei
Controllo negativo	Spontanee	normale	153 ± 15	
Controllo positivo	2AF	normale	716 ± 45	5
Dosi del campione	2 g/piastra	normale	161 ± 6	1.05
	1 g/piastra	normale	154 ± 9	1.01
	0.5 g/piastra	normale	102 ± 10	0.66
	0.2 g/piastra	normale	112 ± 9	0.73
	0.1 g/piastra	normale	110 ± 9	0.72
	0.02 g/piastra	normale	151 ± 20	0.98

TA 98 - S9		Background	Medie revertenti ± deviazione standard	Rapporto revertenti dose/ revertenti spontanei
Controllo negativo	Spontanee	normale	35 ± 11	
Controllo positivo	2NF	normale	407 ± 23	12
Dosi del campione	2 g/piastra	normale	42 ± 3	1.19
	1 g/piastra	normale	34 ± 2	0.96
	0.5 g/piastra	normale	34 ± 5	0.96
	0.2 g/piastra	normale	27 ± 9	0.76
	0.1 g/piastra	normale	36 ± 7	1.01
	0.02 g/piastra	normale	31 ± 11	0.88
TA 100 - S9		Background	Medie revertenti ± deviazione standard	Rapporto revertenti dose/ revertenti spontanei
Controllo negativo	Spontanee	normale	116 ± 28	
Controllo positivo	SA	normale	828 ± 47	7
Dosi del campione	2 g/piastra	normale	115 ± 13	0.99
	1 g/piastra	normale	114 ± 14	0.99
	0.5 g/piastra	normale	117 ± 8	1.01
	0.2 g/piastra	normale	116 ± 8	1.00
	0.1 g/piastra	normale	135 ± 6	1.16
	0.02 g/piastra	normale	115 ± 2	1.00
TA 98 + S9		Background	Medie revertenti ± deviazione standard	Rapporto revertenti dose/ revertenti spontanei
Controllo negativo	Spontanee	normale	22 ± 5	
Controllo positivo	2AF	normale	1218 ± 20	55
Dosi del campione	2 g/piastra	normale	38 ± 4	1.72
	1 g/piastra	normale	35 ± 6	1.57
	0.5 g/piastra	normale	40 ± 8	1.79
	0.2 g/piastra	normale	26 ± 5	1.18
	0.1 g/piastra	normale	32 ± 4	1.43
	0.02 g/piastra	normale	28 ± 6	1.25
TA 100 + S9		Background	Medie revertenti ± deviazione standard	Rapporto revertenti dose/ revertenti spontanei
Controllo negativo	Spontanee	normale	144 ± 14	
Controllo positivo	2AF	normale	1374 ± 29	10
Dosi del campione	2 g/piastra	normale	181 ± 13	1.25
	1 g/piastra	normale	133 ± 9	0.92
	0.5 g/piastra	normale	127 ± 17	0.88
	0.2 g/piastra	normale	136 ± 5	0.94
	0.1 g/piastra	normale	117 ± 13	0.81
	0.02 g/piastra	normale	120 ± 8	0.83

TA 98 - S9		Background	Medie revertenti ± deviazione standard	Rapporto revertenti dose/ revertenti spontanei
Controllo negativo	Spontanee	normale	35 ± 11	
Controllo positivo	2NF	normale	407 ± 23	12
Dosi del campione	2 g/piastra	normale	48 ± 17	1.37
	1 g/piastra	normale	40 ± 4	1.12
	0.5 g/piastra	normale	37 ± 7	1.05
	0.2 g/piastra	normale	27 ± 6	0.77
	0.1 g/piastra	normale	32 ± 10	0.92
	0.02 g/piastra	normale	26 ± 8	0.74
TA 100 - S9		Background	Medie revertenti ± deviazione standard	Rapporto revertenti dose/ revertenti spontanei
Controllo negativo	Spontanee	normale	116 ± 28	
Controllo positivo	SA	normale	828 ± 47	7
Dosi del campione	2 g/piastra	normale	111 ± 8	0.96
	1 g/piastra	normale	128 ± 13	1.11
	0.5 g/piastra	normale	134 ± 7	1.16
	0.2 g/piastra	normale	129 ± 2	1.12
	0.1 g/piastra	normale	132 ± 13	1.14
	0.02 g/piastra	normale	121 ± 12	1.04
TA 98 + S9		Background	Medie revertenti ± deviazione standard	Rapporto revertenti dose/ revertenti spontanei
Controllo negativo	Spontanee	normale	22 ± 5	
Controllo positivo	2AF	normale	1218 ± 20	55
Dosi del campione	2 g/piastra	normale	40 ± 3	1.79
	1 g/piastra	normale	30 ± 10	1.36
	0.5 g/piastra	normale	37 ± 8	1.64
	0.2 g/piastra	normale	25 ± 6	1.10
	0.1 g/piastra	normale	23 ± 4	1.03
	0.02 g/piastra	normale	21 ± 3	0.96
TA 100 + S9		Background	Medie revertenti ± deviazione standard	Rapporto revertenti dose/ revertenti spontanei
Controllo negativo	Spontanee	normale	144 ± 14	
Controllo positivo	2AF	normale	1374 ± 29	10
Dosi del campione	2 g/piastra	normale	133 ± 21	0.92
	1 g/piastra	normale	120 ± 7	0.83
	0.5 g/piastra	normale	129 ± 22	0.89
	0.2 g/piastra	normale	132 ± 24	0.91
	0.1 g/piastra	normale	125 ± 3	0.87
	0.02 g/piastra	normale	134 ± 10	0.93

4. CONCLUSIONI

Dall'analisi dei risultati, per quanto riguarda la formulazione di un giudizio sul campione in oggetto, è possibile effettuare le seguenti considerazioni:

- I test eseguiti hanno evidenziato la risposta positiva dei controlli positivi (mutageni standard con valori $MI \geq 2$ - rapporto trattato/controllo) a dimostrazione della corretta esecuzione del test e della sensibilità di risposta da parte dei ceppi utilizzati (TA 98 e TA100)
- E' stata verificata, in linea generale, la crescita del tappeto di background che è risultato normale
- **Per i campioni SUO-03AP, SUO 04AP, SUO 05 AP, sia con il ceppo TA98 che con il ceppo TA100, in assenza ed in presenza di attivazione metabolica, non sono state riscontrate le condizioni necessarie per la valutazione delle potenzialità mutagene** “(ovvero un campione si considera positivo se due dosi consecutive, oppure la più alta dose che non ha evidenziato tossicità, produce una risposta almeno doppia rispetto al controllo e quando almeno due di queste dosi consecutive hanno mostrato una relazione dose-risposta lineare.”
- Il **campione SUO 02 AP** ha evidenziato una **debole risposta positiva** (rapporto trattato/controllo ≥ 2) **a carico delle prime due dosi (1 g/p e 0.5 g/p)** con il ceppo TA 98 in assenza di attivazione metabolica mentre con il ceppo TA98 in presenza di attivazione metabolica e con il ceppo TA100 non sono state registrate risposte positive (rapporto trattato/controllo ≥ 2). Inoltre, questo effetto è stato evidenziato alle dosi più alte senza una relazione dose-risposta tra le dosi, condizione necessaria per poter formulare un giudizio di positività carico dei campioni stessi.
- il **campione SUO 01 AP** ha registrato una **risposta positiva, con valori $MI \geq 2$** (rapporto trattato/controllo) con il ceppo TA 98 in assenza ed in presenza di attivazione metabolica) **a carico delle prime due dosi 1g/piastra e 0,5 g/piastra**. Il riscontro di una risposta positiva a due differenti dosi testate ha consentito, limitatamente al test con TA 98 senza attivazione metabolica, la rielaborazione dei dati al fine di valutare la presenza di una correlazione dose/risposta (ottenendo un coefficiente di correlazione (R_2) pari a 0.98 ed espressi, in termini quantitativi, come 30 revertenti/grammo.). Con il ceppo TA 100 **non sono state** riscontrate le condizioni necessarie per la valutazione delle potenzialità mutagene.

Sulla base di quanto sopra riportato, in merito ai campioni oggetto di analisi si può osservare che **in tutti i campioni, ad eccezione del campione SUO 01AP, non si sono verificate contemporaneamente le condizioni necessarie per stabilire una positività (mutagenicità) dei campioni,** ovvero:

- il criterio del raddoppio: rapporto tra il numero dei revertenti indotti e il numero dei revertenti spontanei (controllo negativo) è ≥ 2 ,
- sussistenza di una risposta dose-effetto: quando almeno due di queste dosi consecutive evidenziano il criterio del raddoppio mostrando una relazione dose-risposta lineare. (Chu KL, Patel KM, Lin AH, Tarone RE, Linhart MS, Dunkel VC. Evaluating statistical analysis and reproducibility of mutagenicity assay. Mutat Res 1981; 85: 119-132)

5. BIBLIOGRAFIA

1. B.N Ames, H.J. Whitfield Jr – frameshift mutagenesis in salmonella, Cold Spring Harboir Symp. Quant. Biol. 23 (1966), 221-225
2. B.N. Ames, F.D. Lee, W.E. Durston- An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens – Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 70 (1973) – 782- 786
3. OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) Guideline for testing of Chemicals, test Guidelines 471: bacterial Reverse Mutation Test, OECD, Paris, France, 1997 rev. 2020
4. EPA Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5100 Bacterial Reverse Mutation test – 1998
5. Standard Methods 21st ed. 2005 Method 8030 B – salmonella Microsomal Mutagenicity Test
6. ISO 11350:2012 – Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water – Salmonella/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test)
7. L. Migliore Mutagenesi Ambientale – ed. Zanichelli 2004
8. Richard V. Williamsa, David M. DeMarinib, Leon F. Stankowski Jr.c, Patricia A. Escobard, Errol Zeigere, Jonathan Howef, Rosalie Elespurug, Kevin P. Crossh Are all bacterial strains required by OECD mutagenicity test Guideline TG471 needed? – Mutat Res Gen Tox En 848 (2019) 503081