



Sezione Provinciale di Parma  
Viale Bottego, 9  
43100 - Parma  
Tel. 0521/976.111  
Fax 0521/976.112  
E-mail: sezpr@arpa.emr.it

Laboratorio Tematico Mutagenesi Ambientale  
Via Spalato, 4  
43100 Parma  
Tel. 0521/ 381.200  
fax 0521/381.239

Parma, 29 giugno 2012

**Alla c. a.**  
**Dott.ssa Enrica Canossa**  
**Arpa Emilia-Romagna, Sez.Prov.le di Ferrara**

**Esito del monitoraggio della genotossicità del PM<sub>2,5</sub> nel sito “Cassana”  
nel periodo luglio 2011 – febbraio 2012  
Report finale**

Nella presente relazione tecnica si riportano i risultati relativi al secondo anno di monitoraggio della genotossicità del PM<sub>2,5</sub> campionato nel sito di Cassana nel periodo luglio 2011 – febbraio 2012, insieme a quelli del periodo precedente. I dati derivanti dal monitoraggio a Cassana sono stati messi a confronto con i dati relativi alla centralina di fondo urbano parco (Villa Fulvia), già parte della rete di monitoraggio della mutagenicità del PM<sub>2,5</sub> di Arpa Emilia-Romagna. Per questo motivo il monitoraggio in località Cassana è stato effettuato negli stessi mesi in cui si effettua il monitoraggio della genotossicità del PM<sub>2,5</sub> nei nodi della rete regionale: **gennaio, febbraio, luglio, novembre e dicembre.**

Sui campioni sono stati effettuati gli stessi test di genotossicità *in vitro* che, di prassi, vengono effettuati sui campioni di PM<sub>2,5</sub> della rete regionale:

- **test di reversione batterica** sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* in presenza e in assenza di attivazione metabolica esogena;
- **test della Cometa** (Comet assay) su leucociti umani coltivati *in vitro*.



Sezione Provinciale di Parma  
Viale Bottego, 9  
43100 - Parma  
Tel. 0521/976.111  
Fax 0521/976.112  
E-mail: sezpr@arpa.emr.it

L'utilizzo di test con endpoints genetici differenti permette di valutare la presenza di sostanze in grado di provocare danni al materiale genetico con diversi meccanismi d'azione. L'informazione che questi test forniscono è molto importante in quanto segnalano un possibile rischio, derivante dall'esposizione alle sostanze che agiscono sul DNA, sia per l'uomo che per l'ambiente.

### **Trattamento dei campioni**

Ogni campione da sottoporre ai test, è costituito dall'insieme di tutti i filtri giornalieri dell'intero mese di campionamento.

I campioni di  $PM_{2,5}$  sono stati estratti, tramite apparato Soxhlet, in acetone (Acetone RS per pesticidi), il solvente è stato evaporato mediante rotavapor ed il residuo secco è stato risospeso in Dimetilsolfossido (DMSO RPE-ACS) ad una concentrazione finale di  $50 \text{ m}^3/\text{ml}$  per l'esecuzione del test su Salmonella e di  $200 \text{ m}^3/\text{ml}$  per il test della Cometa.

### **Determinazione Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) e Nitro-IPA**

La determinazione degli IPA e dei Nitro-IPA è stata effettuata presso la Sezione Provinciale di Ravenna, nell'ambito delle attività del laboratorio di Riferimento Analitico Regionale "Microinquinanti Organici" (RAR MO), negli stessi estratti di particolato ( $PM_{2,5}$ ) da sottoporre a test di mutagenesi.

L'aliquota degli estratti organici è stata sottoposta a purificazione per cromatografia su colonna di adsorbimento impaccata con gel di silice disattivata al 3% con acqua, secondo le modalità riportate nel metodo EPA 3630C. L'eluizione di IPA e Nitro-IPA è avvenuta in un'unica frazione con una miscela toluene/diclorometano 80:20.

La determinazione analitica finale degli IPA è stata effettuata per gascromatografia ad alta risoluzione interfacciata ad uno spettrometro di massa quadrupolare a bassa risoluzione (HRGC/LRMS), attraverso la registrazione e la misura delle correnti ioniche relative ai picchi molecolari ( $M_i$ )<sup>+</sup> e ai picchi isotopici ( $M_i+1$ )<sup>+</sup>.

IPA rilevati: naftalene, acenaftilene, acenaftene, fluorene, fenantrene, antracene, fluorantene, pirene, benzo (a) antracene, ciclopenta (cd) pirene, crisene, benzo (b) fluorantene, benzo (k) fluorantene, benzo (e) pirene, benzo (a) pirene, indeno (1,2,3-cd) pirene, dibenzo (a,h+a,c)



Sezione Provinciale di Parma  
Viale Bottego, 9  
43100 - Parma  
Tel. 0521/976.111  
Fax 0521/976.112  
E-mail: sezpr@arpa.emr.it

antracene, benzo (ghi) perilene; dibenzo (a,l) pirene, dibenzo (a,e) fluorantene, dibenzo (a,e) pirene, dibenzo (a,i) pirene, dibenzo (a,h) pirene.

La determinazione analitica finale dei Nitro-IPA e dell'Ossi-IPA 3-nitrobenzantrone è stata effettuata per gascromatografia ad alta risoluzione interfacciata ad uno spettrometro di massa a trappola ionica a bassa risoluzione (HRGC/LRMS) in modalità chimica negativa, usando come gas reagente metano, attraverso la registrazione e la misura delle correnti ioniche relative ai picchi molecolari (Mi) e ai picchi isotopici (Mi+1).

Nitro-IPA rilevati: 1-nitronaftalene, 2-nitronaftalene, 2-nitro+3-nitro fluorantene, 9-nitroantracene, 9-nitrofenantrene, 1-nitropirene, 7-nitrobenzo (a) antracene, 6-nitrocrisene, 6-nitrobenzo (a) pirene, 3-nitrobenzantrone, 1,6-dinitropirene e 1,8-dinitropirene.

Ossi-IPA rilevato: 3-nitrobenzantrone.

## **Test di Mutagenesi**

### ***Test su Salmonella***

Gli estratti dei campioni sono stati sottoposti a test di mutagenesi sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* (metodo di incorporazione in piastra) in accordo con i metodi standard (Maron DM, Ames BN. 1983).

Nel test di Ames si utilizzano ceppi di batteri recanti differenti mutazioni nel gene codificante per la biosintesi 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 di diverso tipo a livello di una o poche coppie di basi nel DNA (mutazioni puntiformi); in particolare il ceppo TA98 rileva mutazioni per inserzione o delezione di basi, mentre il ceppo TA100 rileva mutazioni per sostituzione di basi.



Sezione Provinciale di Parma  
Viale Bottego, 9  
43100 - Parma  
Tel. 0521/976.111  
Fax 0521/976.112  
E-mail: sezpr@arpa.emr.it

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 (S9) di ratti nei quali è stata stimolata l'attività degli enzimi epatici.

Per ogni campione sono state saggiate tre concentrazioni e per ogni concentrazione sono state eseguite tre repliche indipendenti. Per ogni test (TA98 con, TA98 senza, TA100 con, TA100 senza attivazione metabolica) i revertenti sono stati contati dopo 48 ore di incubazione delle piastre in termostato a +37°C.

Ogni dose dei campioni è stata saggiata su circa  $10^7$  batteri.

### **Test della Cometa**

Il Test della Cometa, o Comet assay, evidenzia rotture a singolo e/o doppio filamento del DNA e siti in cui la struttura del DNA è deformata (basi o danneggiate o mancanti, cross link, siti detti alcalo-labili che in condizioni alcaline possono diventare rotture). Questo test rileva un danno primario nelle singole cellule non ancora riparato, né fissato.

Il test viene eseguito in accordo con il metodo di Singh *et al.* (1988): leucociti, da sangue periferico, di donatori sani non fumatori, vengono incubati con concentrazioni scalari di estratto per un'ora a +37°C. Dopo incubazione le cellule vengono lisate e il DNA, racchiuso in agar, 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, con lunghezza e intensità luminosa proporzionali alla quantità di DNA migrato nella corsa elettroforetica e quindi al danno. Per ogni campione sono state saggiate 3 dosi, con due repliche ciascuna, a parte il campione di luglio 2010 in cui è stata saggiata anche una dose intermedia.

Ogni dose dei campioni è stata saggiata su circa  $10^6$  leucociti.

## **Valutazione e rappresentazione dei dati**

### ***Test su Salmonella***

Per stabilire la positività (mutagenicità) dei campioni in esame si applica il criterio del raddoppio, cioè un campione si considera positivo quando il trattato/controllo, cioè il rapporto tra il numero dei revertenti indotti alla dose più alta saggiata, non tossica, e il numero dei revertenti spontanei (controllo negativo), è maggiore o uguale a 2 (Chu KL *et al.*, 1981).

Per l'analisi quantitativa si ricava il valore dei revertenti/m<sup>3</sup> di aria e dei revertenti/μg di particolato dal coefficiente angolare della retta di regressione, ottenuta dal numero di revertenti riscontrati in ciascuna delle piastre per ogni dose (m<sup>3</sup> di aria aspirata equivalenti o μg di particolato), 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 rappresentare l'effetto mutageno totale dei campioni si utilizza il Fattore di Genotossicità che si ottiene sommando gli effetti dei quattro test effettuati su Salmonella, più precisamente si utilizzano i rapporti tra i valori dei trattati e dei loro rispettivi controlli (Rossi C *et al.*, 1992).

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata con pacchetto statistico SPSS: in specifico sono state utilizzate Anova e t di Student.

### ***Test della Cometa***

Il danno al DNA viene misurato mediante un sistema computerizzato di analisi dell'immagine (Comet assay IV, Perceptive Instruments, UK). Fra i parametri restituiti dal programma per descrivere le comete, è stata scelta la percentuale di intensità di fluorescenza del DNA nella coda della cometa (TI%) rispetto al totale, parametro, raccomandato in letteratura, che definisce l'effetto genotossico del campione misurando la quantità di DNA migrato.

Per ogni dose vengono misurate duecento cellule (100 cellule in ciascuna replica).

Il potenziale effetto tossico degli estratti è stato valutato prima dell'elettroforesi, subito dopo il trattamento, come riduzione della vitalità cellulare (mortalità) utilizzando il metodo della doppia colorazione Hoechst/bromuro di etidio: un campione si definisce tossico ad una certa dose, quando



Sezione Provinciale di Parma  
Viale Bottego, 9  
43100 - Parma  
Tel. 0521/976.111  
Fax 0521/976.112  
E-mail: sezpr@arpa.emr.it

la mortalità cellulare supera il 30%; in questo caso non viene quantificata la genotossicità di quella dose.

Inoltre, durante la fase di lettura, viene valutata la percentuale di cellule “hedgehogs” (porcospino): cellule fortemente danneggiate che hanno perso la forma della cometa e presentano nuclei completamente dispersi, fra queste possono anche essere presenti cellule che hanno attivato processi di “morte programmata” (apoptosi).

La positività di un campione viene definita, confrontando le dosi con la rispettiva dose zero, mediante il test della mediana condotto con pacchetto statistico SPSS 14. Il valore quantitativo del danno ( $TI\%/m^3$ ) è dato dal coefficiente angolare delle rette di regressione dose-effetto dei campioni positivi e di quelli che presentano, comunque, un  $R^2 \geq 0,6$ .

L'analisi statistica fra i campioni è stata effettuata con pacchetto statistico SPSS: in specifico sono state utilizzate Anova e t di Student.

## **Risultati**

### ***Test su Salmonella***

Le concentrazioni di  $PM_{2,5}$  saggiate su Salmonella sono state 2 - 4 - 8  $m^3$  di aria equivalenti. I campioni prelevati in luglio 2011 a villa Fulvia e a Cassana, sono risultati negativi in tutti i test condotti su Salmonella (rapporto trattato/controllo inferiore a 2 – vedi rapporti di prova n° 44927 e n° 44932). I campioni prelevati in entrambi i siti, nei mesi di novembre e dicembre 2011 e di gennaio e febbraio 2012, sono risultati positivi in tutti i test su Salmonella (rapporto trattato/controllo  $\geq 2$  - vedi rapporti di Prova n°: 70487, 70488, 1702, 1701, 6008, 6007, 12414, 12413). In entrambi i siti, si conferma la presenza diffusa di sostanze mutagene che seguono un andamento stagionale portando a valori di Fattore di Genotossicità – FG (vedi *Valutazione e rappresentazione dei dati*) più elevati, generalmente “fortemente positivi”, nei periodi più freddi e valori “negativi” in luglio (Tab.1 e Fig.1). Nel periodo novembre 2011 – gennaio 2012 si riscontrano valori di FG più elevati rispetto allo stesso periodo 2010-2011, sia per quanto riguarda Ferrara Villa Fulvia che Cassana (t di Student,  $p < 0.05$ ).

Si ricorda che, in generale, la mutagenicità del particolato atmosferico, rilevata con i test su Salmonella, nei mesi più caldi presenta valori più bassi (i campioni sono quasi sempre negativi) rispetto ai mesi più freddi. Questa stagionalità è nota in letteratura ed è ben evidente nelle serie

storiche dei dati relativi alla mutagenicità del PM campionato nei diversi nodi della rete regionale dell'Emilia-Romagna (vedi sito web del Laboratorio Tematico Mutagenesi Ambientale [www.arpa.emr.it/mutagenesi](http://www.arpa.emr.it/mutagenesi)).

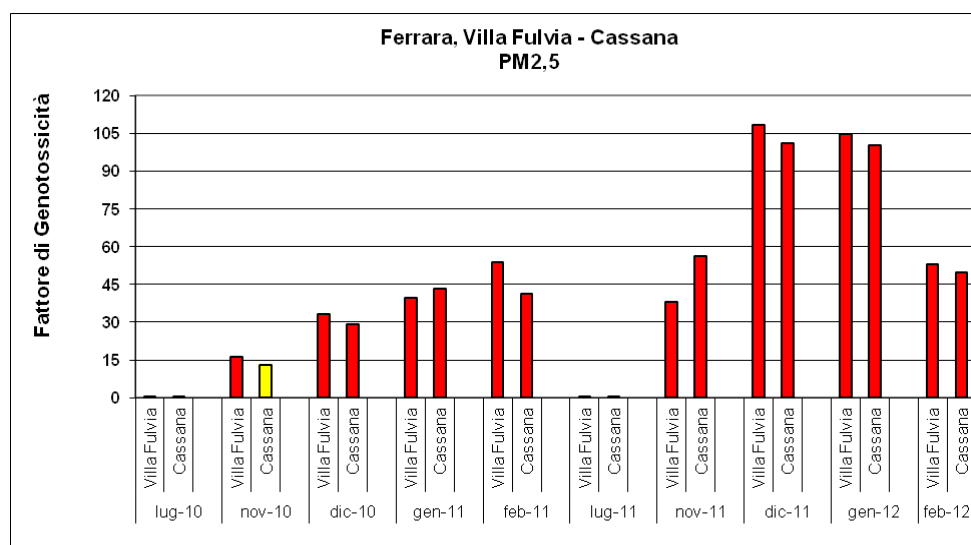
**Tabella 1 e Figura 1** – Mutagenicità del particolato atmosferico (PM<sub>2,5</sub>) rilevata come Fattore di Genotossicità - FG - in *Salmonella typhimurium*.

Intervalli di positività	Giudizio
$FG \leq 1,4$	negativo
$1,5 \leq FG \leq 2,9$	debolmente positivo
$3,0 \leq FG \leq 14,9$	positivo
$FG \geq 15,0$	fortemente positivo

**Tabella 1**

	<b>Ferrara Villa Fulvia</b>	<b>Cassana</b>
<b>lug-10</b>	0,4	0,6
<b>nov-10</b>	16,1	12,8
<b>dic-10</b>	33,3	29,1
<b>gen-11</b>	39,7	43,3
<b>feb-11</b>	54	41,3
<b>lug-11</b>	0,5	0,4
<b>nov-11</b>	38,2	56,1
<b>dic-11</b>	108,4	101
<b>gen-12</b>	104,7	100,4
<b>feb-12</b>	53,2	49,8

**Figura 1**





Sezione Provinciale di Parma  
Viale Bottego, 9  
43100 - Parma  
Tel. 0521/976.111  
Fax 0521/976.112  
E-mail: sezpr@arpa.emr.it

Per quanto riguarda l'aspetto "qualitativo" della mutagenicità (es.: induzione di mutazioni per sostituzione piuttosto che per inserzione o delezione di basi, presenza di mutageni diretti o di promutageni), si osserva una maggiore sensibilità nei test condotti in assenza di attivazione metabolica in entrambi i ceppi, per tutti i campioni, in maniera statisticamente significativa (t di Student,  $p < 0.05$ ) evidenziando una prevalenza di sostanze ad azione mutagena diretta (Tab.2 e 3, Fig.2A,B). In entrambi i siti si osserva, per la maggior parte dei test, un aumento della mutagenicità nel periodo autunno 2011 – inverno 2012 rispetto allo stesso periodo 2010 – 2011 (t di Student,  $p < 0.05$ , Tab.2 e 3, Fig.2A,B). Il maggior numero dei revertenti indotti per metro cubo di aria riscontrato nel periodo autunno 2011 – inverno 2012 sembra essere dovuto, non ad un aumento della concentrazione di particolato (Fig.3) che risulta comparabile tra i due periodi (t di Student) ma ad una maggiore attività mutagena specifica dello stesso (numero di revertenti indotti per microgrammo di particolato – Fig.2B, t di Student,  $p < 0.05$ ). L'evoluzione temporale della mutagenicità del particolato atmosferico, espressa come media dei revertenti/ $m^3$ , infatti è confrontabile con l'andamento delle concentrazioni medie mensili ( $\mu g/m^3$ ) delle polveri (Fig.3) e si riscontra una buona correlazione tra i due parametri soprattutto per quanto riguarda Villa Fulvia dove la rette di regressione presenta un  $R^2$  di 0,8, mentre per quanto riguarda Cassana la rette di regressione presenta un  $R^2$  di 0,6.

Confrontando la mutagenicità del PM prelevato nei due siti, valutata come numero di revertenti per microgrammo di particolato (Tab.3, Fig.2B), si evidenzia una maggiore attività mutagena del PM prelevato a Villa Fulvia in tutti i periodi monitorati (t di Student,  $p < 0.001$ ). Mentre se si confronta il numero di revertenti per metro cubo d'aria la differenza fra i due siti non è statisticamente significativa (Tab.2, Fig.2A). Questa discrepanza è spiegata dal fatto che a Villa Fulvia, rispetto a Cassana, è presente una minore quantità di particolato ( $\mu g/m^3$ ) (t di Student,  $p < 0.001$ ) ma con una maggiore concentrazione di sostanze mutagene per microgrammo di polvere e/o una presenza di sostanze con attività mutagena più elevata (Fig.3).



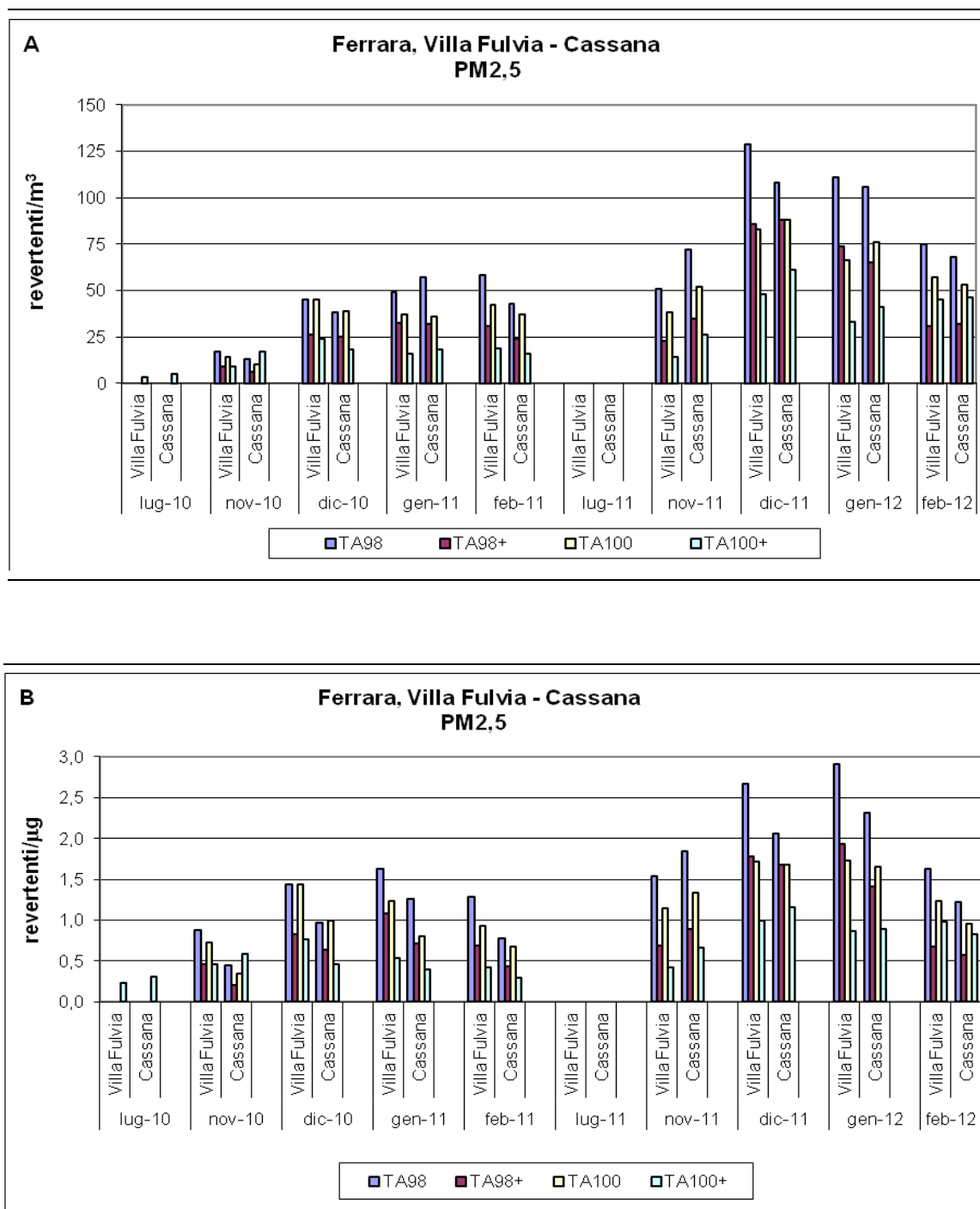
**Tabella 2 - Valori dei revertenti/m<sup>3</sup> calcolati dalla retta di regressione dose/effetto, in tutti i test eseguiti sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* con (+) e senza attivazione metabolica esogena, nei siti e nei periodi indicati.**

Periodo di campionamento PM2,5	Sito di campionamento	revertenti/m <sup>3</sup>			
		TA98	TA98+	TA100	TA100+
lug-10	V.Fulvia	0	0	0	3
	Cassana	0	0	0	5
nov-10	V.Fulvia	17	9	14	9
	Cassana	13	6	10	17
dic-10	V.Fulvia	45	26	45	24
	Cassana	38	25	39	18
gen-11	V.Fulvia	49	33	37	16
	Cassana	57	32	36	18
feb-11	V.Fulvia	58	31	42	19
	Cassana	43	24	37	16
lug-11	V.Fulvia	0	0	0	0
	Cassana	0	0	0	0
nov-11	V.Fulvia	51	23	38	14
	Cassana	72	35	52	26
dic-11	V.Fulvia	129	86	83	48
	Cassana	108	88	88	61
gen-12	V.Fulvia	111	74	66	33
	Cassana	106	65	76	41
feb-12	V.Fulvia	75	31	57	45
	Cassana	68	32	53	46

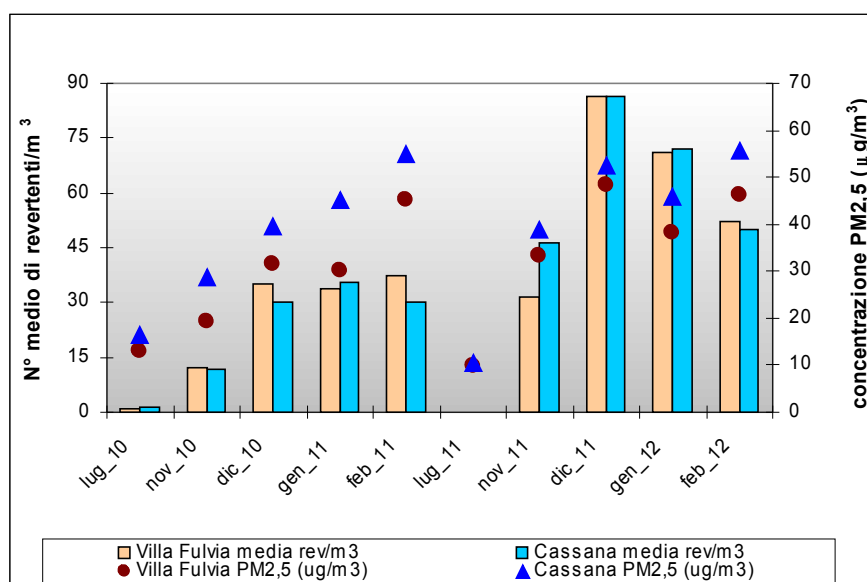
**Tabella 3 - Valori dei revertenti/μg di polveri (PM<sub>2,5</sub>) calcolati dalla retta di regressione dose/effetto, in tutti i test eseguiti sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* con (+) e senza attivazione metabolica esogena, nei siti e nei periodi indicati.**

Periodo di campionamento PM2,5	Sito di campionamento	revertenti/μg			
		TA98	TA98+	TA100	TA100+
lug-10	V.Fulvia	0,000	0,000	0,000	0,229
	Cassana	0,000	0,000	0,000	0,306
nov-10	V.Fulvia	0,875	0,463	0,721	0,463
	Cassana	0,452	0,209	0,348	0,591
dic-10	V.Fulvia	1,434	0,829	1,434	0,765
	Cassana	0,965	0,635	0,990	0,457
gen-11	V.Fulvia	1,627	1,083	1,229	0,531
	Cassana	1,265	0,710	0,799	0,400
feb-11	V.Fulvia	1,288	0,688	0,933	0,422
	Cassana	0,780	0,435	0,671	0,290
lug-11	V.Fulvia	0,000	0,000	0,000	0,000
	Cassana	0,000	0,000	0,000	0,000
nov-11	V.Fulvia	1,542	0,695	1,149	0,423
	Cassana	1,874	0,898	1,334	0,667
dic-11	V.Fulvia	2,673	1,782	1,720	0,994
	Cassana	1,591	1,297	1,297	0,899
gen-12	V.Fulvia	2,904	1,936	1,727	0,863
	Cassana	2,312	1,418	1,658	0,894
feb-12	V.Fulvia	1,627	0,672	1,236	0,976
	Cassana	1,218	0,573	0,950	0,824

**Figura 2 - Genotossicità del PM<sub>2,5</sub> espressa come revertenti/m<sup>3</sup> aria (A) e revertenti/μg polveri (B) in *Salmonella typhimurium* ceppi TA98 e TA100 con (+) e senza (-) attivazione metabolica esogena, nei siti e nei periodi indicati.**



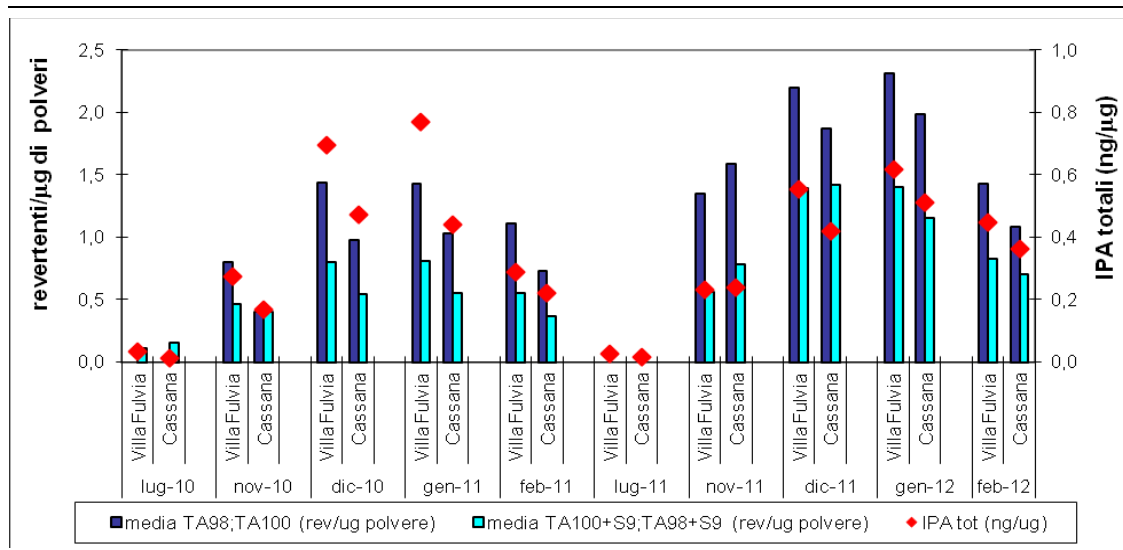
**Figura 3 - Andamenti comparati della mutagenicità del particolato atmosferico urbano, PM<sub>2,5</sub> (media dei revertenti/m<sup>3</sup> indotti da estratti di campioni mensili) e delle concentrazioni (medie mensili) delle polveri, nei periodi e nei siti indicati.**



Per valutare il contributo degli IPA alla mutagenicità del PM sono state messe a confronto le concentrazioni medie di IPA, dotati di attività biologica ( $\Sigma$  fluorantene, pirene, benzo (a) antracene, ciclopenta (c,d) pirene, crisene, benzo (b) fluorantene, benzo (k) fluorantene, benzo (e) pirene, benzo (a) pirene, indeno (1,2,3-cd) pirene, dibenzo (a,h+a,c) antracene, benzo (g,h,i) perilene; dibenzo (a,l) pirene, dibenzo (a,e) fluorantene, dibenzo (a,e) pirene, dibenzo (a,i) pirene, dibenzo (a,h) pirene), con l'attività mutagena del particolato, riportata sia come media dei revertenti indotti in assenza di attivazione metabolica (S9), che come media dei revertenti ottenuti dai test condotti in presenza di S9, sensibili alla presenza di IPA (Fig. 4). Si evidenzia che, anche se non sempre esiste una corrispondenza assoluta, l'andamento delle concentrazioni di IPA segue quello dell'attività mutagena ma si evidenzia un forte contributo alla mutagenicità del PM anche da parte di sostanze ad azione mutagena diretta.

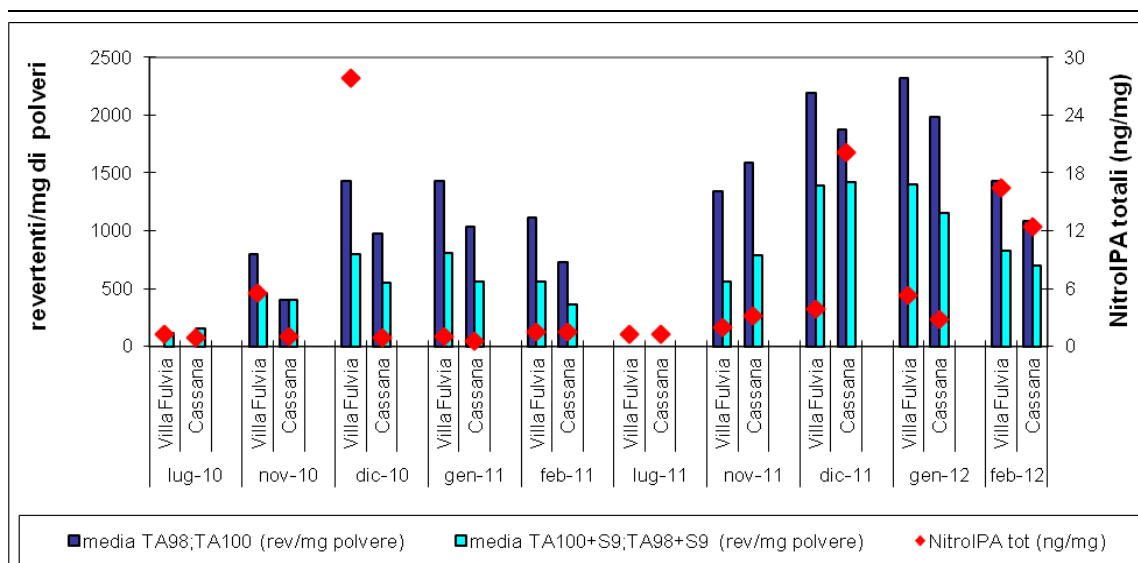
Inoltre la maggiore concentrazione di IPA sull'intero periodo è stata riscontrata a Villa Fulvia (t di Student,  $p < 0.05$ ).

**Figura 4 - Comparazione dei livelli di IPA dotati di attività biologica (vedi testo) e attività genotossica determinata con i test sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* con (+S9) e senza attivazione metabolica.**



In Figura 5 si riporta il grafico relativo al confronto tra le concentrazioni medie di Nitro-IPA compreso l'unico Ossi-IPA rilevato, il 3-nitrobenzantrone, con l'attività mutagenica del particolato, riportata sia come media dei revertenti indotti in assenza di attivazione metabolica che come media dei revertenti ottenuti dai test condotti in presenza di S9. Nel periodo monitorato, per lo più non si riscontra corrispondenza tra la maggiore attività mutagenica diretta e la maggiore concentrazione di Nitro-IPA, evidenziando il contributo di altre sostanze ad azione mutagenica diretta, che non sono tra quelle rilevate, alla mutagenicità del PM campionato sia a Villa Fulvia che a Cassana.

**Figura 5 - Comparazione dei livelli di Nitro-IPA ( $\Sigma$  1-nitronaftalene, 2-nitronaftalene, 9-nitroantracene, 9-nitrofenantrene, 2-nitro+3-nitrofluorantene, 1-nitropirene, 7-nitrobenzo(a)antracene, 6-nitrocrisene, 3-nitrobenzantrone, 1,6-dinitropirene, 1,8-dinitropirene, 6-nitrobenzo(a)pirene) e attività genotossica determinata con i test sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* con (+S9) e senza attivazione metabolica.**



### Test della cometa

In Figura 6 vengono illustrati i risultati ottenuti su tutti i campioni nell'intero periodo di monitoraggio (luglio 2010 – febbraio 2012) per ogni dose saggiata sono riportati la percentuale dell'intensità di fluorescenza del DNA nella coda della cometa (TI%) e la percentuale di cellule che hanno perso la configurazione di cometa e che appaiono come "hedgehogs" (porcospini).

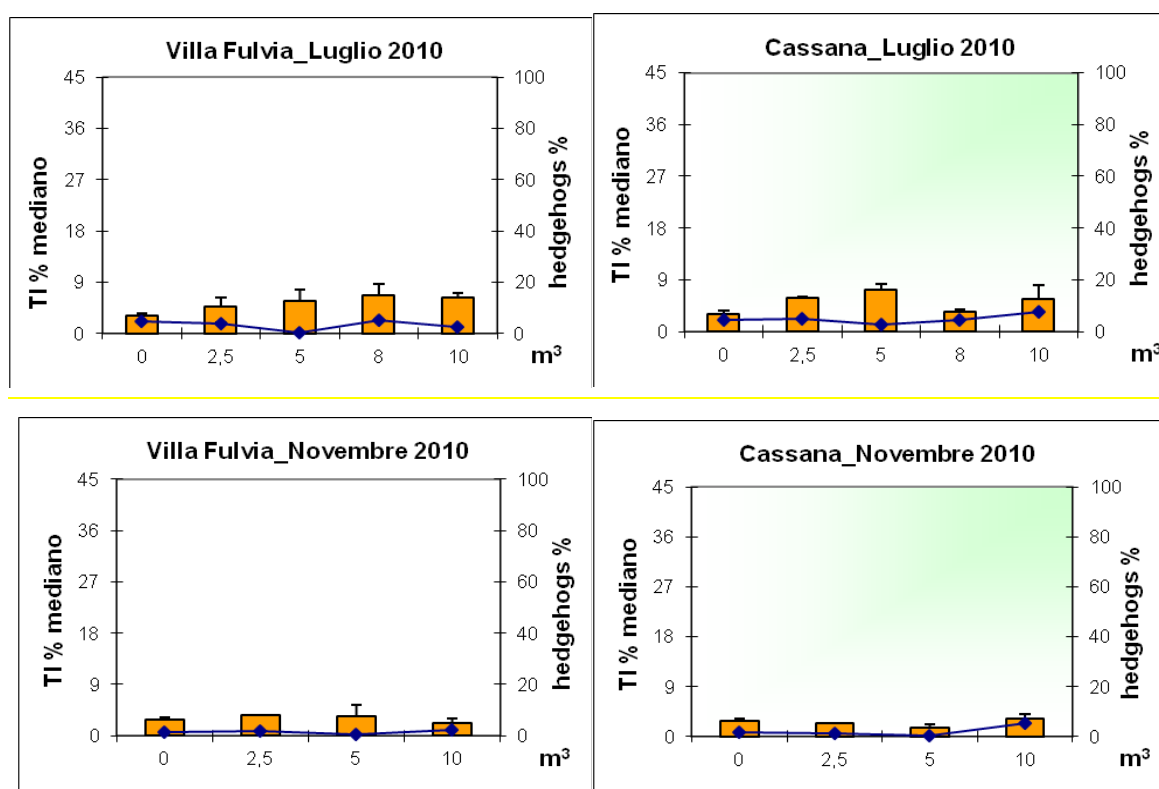
In nessun campione è stato rilevato effetto tossico, inteso sia come vitalità cellulare post incubazione sia come aumento di cellule hedgehogs in fase di lettura (vedi Valutazione e rappresentazione dei dati).

La genotossicità rilevata con questo test evidenzia un andamento stagionale comparabile a quello riscontrato con i test su *Salmonella*. Infatti nel periodo luglio 2010 – febbraio 2012, sono risultati positivi, per entrambi i siti, tutti i campioni prelevati nei mesi più freddi, con l'eccezione del mese di novembre 2010 (test della mediana), mentre i campioni di luglio sono risultati negativi. Questo effetto viene valutato come aumento di danno statisticamente significativo rispetto al proprio

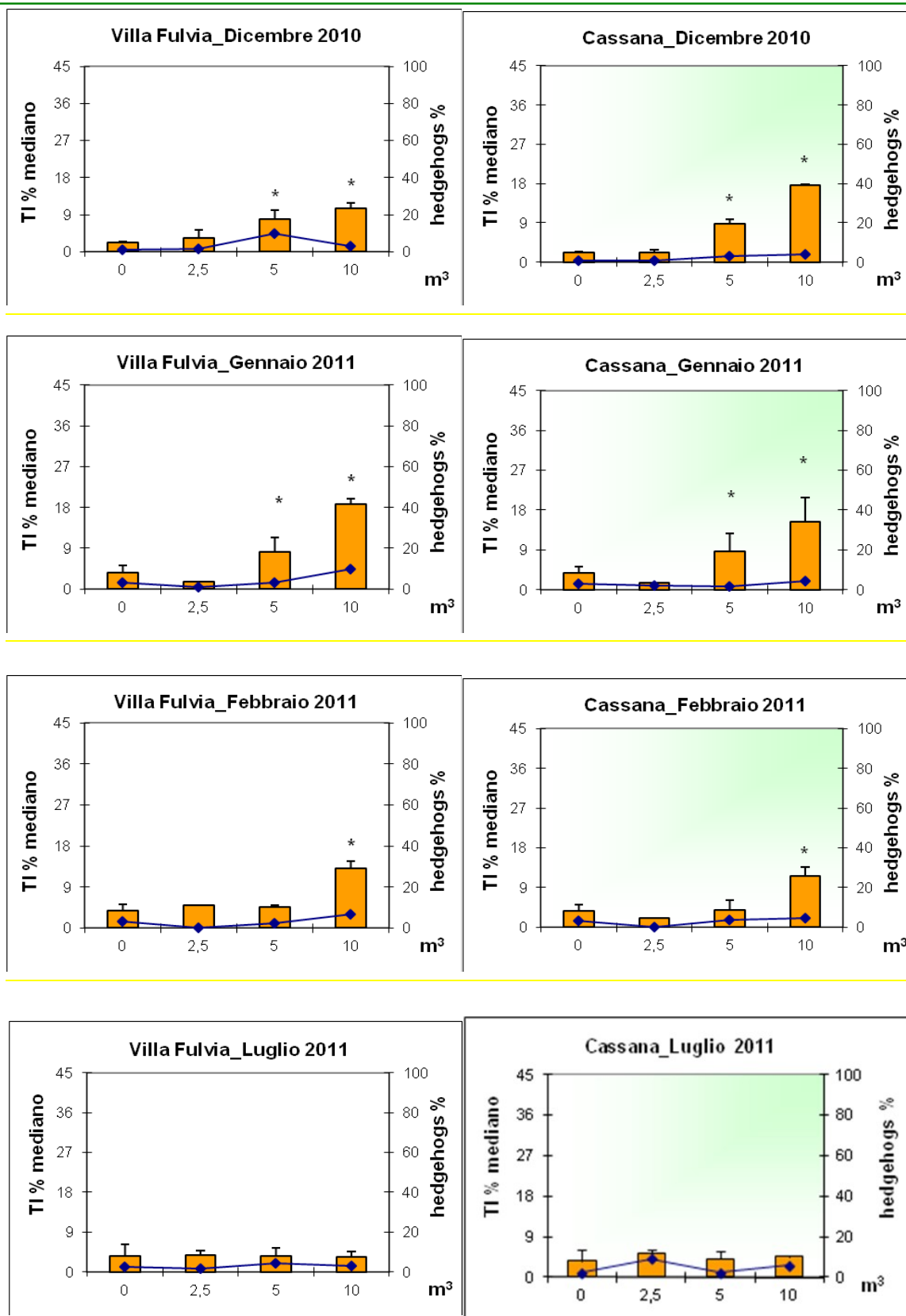
controllo, espresso nel grafico come dose 0 (Fig. 6). In Figura 7 sono riassunti, in un unico grafico, i risultati relativi ai campioni prelevati a Villa Fulvia e a Cassana, espressi come valori dei coefficienti angolari ottenuti dalle curve dose effetto dei campioni positivi e/o con  $R^2$  maggiore o uguale a 0,6, nell'intero periodo di monitoraggio. Si riscontra, anche con questo test, per entrambi i siti, un aumento della genotossicità nel periodo novembre 2011 – febbraio 2012 rispetto allo stesso periodo 2010 – 2011 (t di Student,  $p < 0.05$ ).

Nei mesi di novembre 2011, dicembre 2011 e febbraio 2012 è evidente una maggiore attività genotossica di Cassana rispetto a Ferrara (t di Student,  $p < 0.05$ ).

**Figura 6 - Grafici dose-risposta dei campioni prelevati a Villa Fulvia e a Cassana nei mesi indicati: per ogni dose vengono riportati il danno al DNA - espresso come percentuale di TI - e la tossicità indotta dal campione - espressa come hedgehogs (vedi testo).**

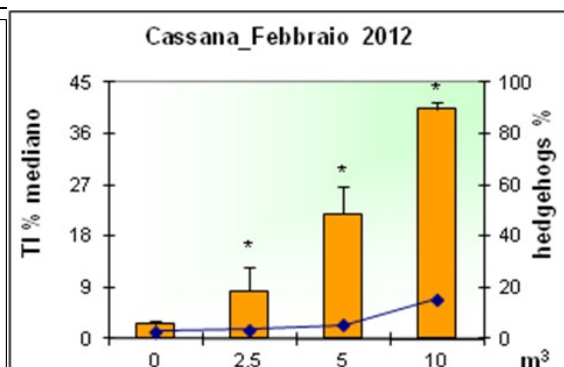
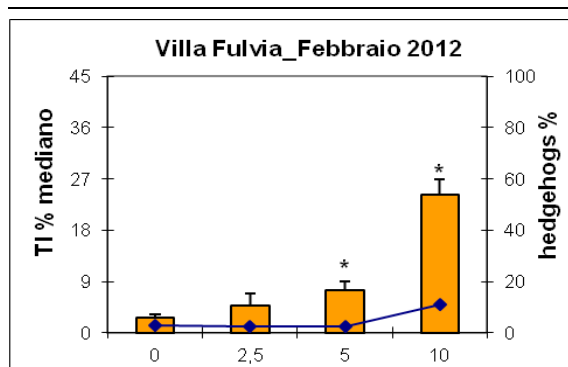
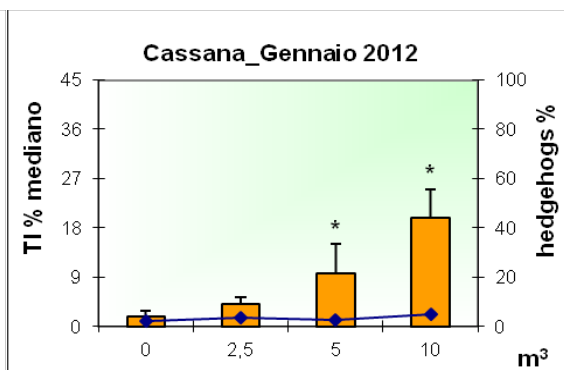
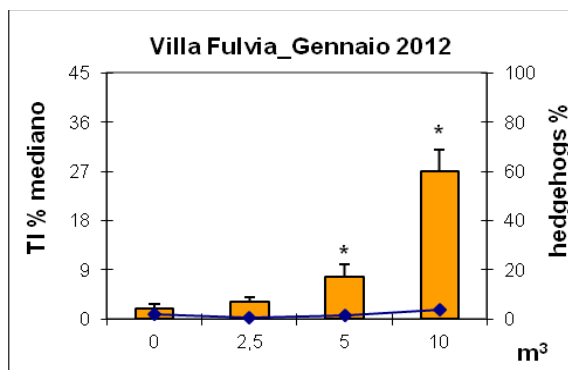
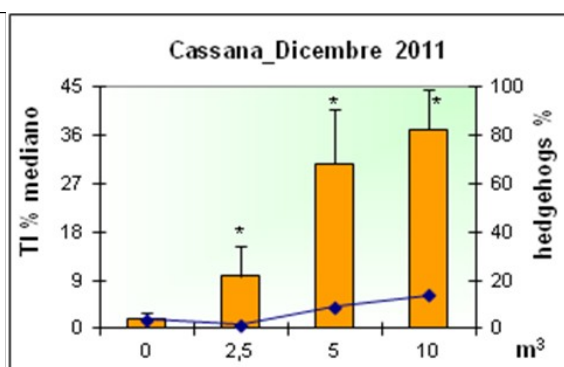
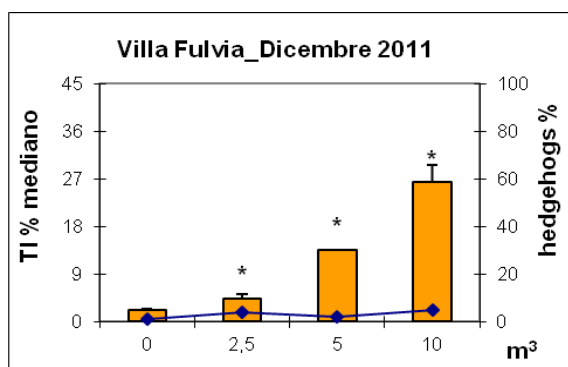
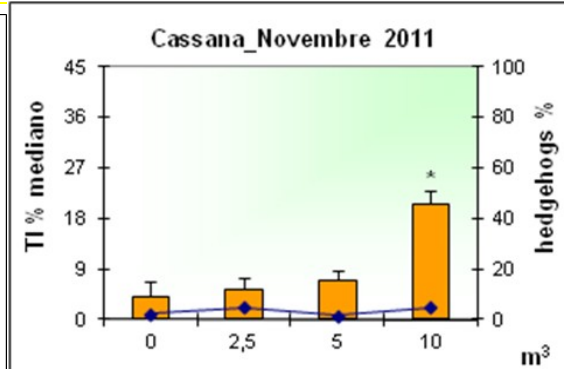
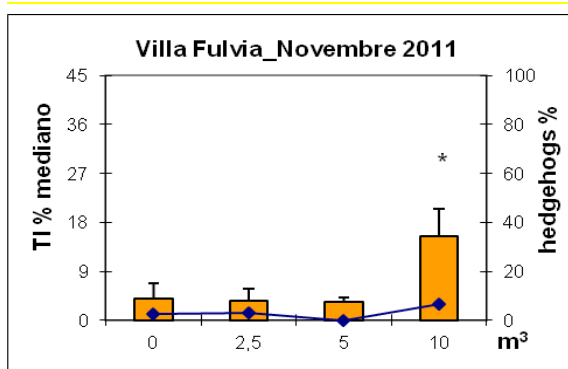


\* positività ottenuta con test della mediana ( $p < 0,001$ )



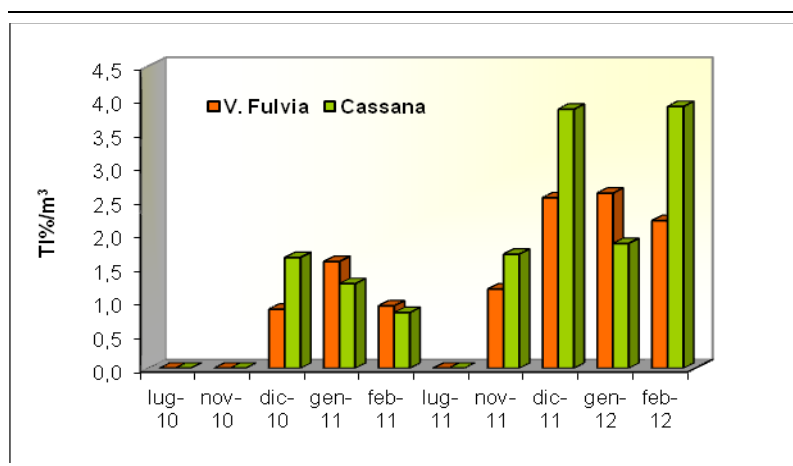
\* positività ottenuta con test della mediana ( $p < 0,001$ )





\* positività ottenuta con test della mediana ( $p < 0,001$ )

**Figura 7 – Andamento del danno indotto per metro cubo d'aria equivalente (espresso come percentuale di TI, vedi testo) ottenuto dai coefficienti angolari delle curve dose effetto dei campioni positivi e/o con R<sup>2</sup> maggiore o uguale a 0,6.**



## CONCLUSIONI

Si conferma, sia per Villa Fulvia che per Cassana, la stagionalità della mutagenicità rilevata dai test con Salmonella, già riscontrata nella serie storica dei dati relativi alla rete regionale di monitoraggio della mutagenicità del PM in ambiente urbano, con valori più alti nei mesi più freddi e valori più bassi o negativi nel periodo estivo. Anche l'andamento della genotossicità, rilevata con il test della Cometa, presenta un andamento stagionale, anche se non completamente sovrapponibile a quello evidenziato dai test su Salmonella, infatti il PM prelevato in entrambi i siti, in novembre 2010, è risultato negativo nel test della Cometa, mentre è risultato positivo nei test su Salmonella. Confrontando la mutagenicità, rilevata con i test su Salmonella, dei campioni prelevati a Villa Fulvia e a Cassana, non si riscontrano differenze per quanto riguarda l'aspetto "qualitativo" della mutagenicità (es.: induzione di mutazioni per sostituzione piuttosto che per inserzione o delezione di basi, presenza di mutageni diretti o di promutageni). Infatti per tutti i campioni si osserva una maggiore sensibilità nei test condotti in assenza di attivazione metabolica in entrambi i ceppi, evidenziando una prevalenza di sostanze ad azione mutagena diretta. Per quanto riguarda l'aspetto "quantitativo", si riscontra, in entrambi i siti, una maggiore mutagenicità nel periodo novembre 2011 – febbraio 2012 rispetto allo stesso periodo 2010 – 2011.



Sezione Provinciale di Parma  
Viale Bottego, 9  
43100 - Parma  
Tel. 0521/976.111  
Fax 0521/976.112  
E-mail: sezpr@arpa.emr.it

Il confronto tra la concentrazione di IPA e i test su Salmonella in particolare quelli condotti in presenza di attivazione metabolica esogena, più sensibili alla presenza di questa classe di contaminanti, evidenzia che, anche se non sempre esiste una corrispondenza assoluta, l'andamento delle concentrazioni di IPA segue quello dell'attività mutagenica. Si evidenzia anche un forte contributo alla mutagenicità del PM da parte di sostanze ad azione mutagenica diretta tuttavia non appartenenti ai derivati degli IPA rilevati. Infatti dai dati relativi al confronto tra Nitro-IPA ed effetto mutageno, si evince l'importanza di altre sostanze, associate al PM<sub>2,5</sub>, ad azione mutagenica diretta e cioè che possono agire direttamente sul DNA senza bisogno di essere metabolizzate per esercitare il loro effetto genotossico.

Come già evidenziato in altre indagini, l'effetto biologico delle miscele complesse, quale è il particolato atmosferico, non può essere spiegato con l'analisi chimica attraverso la ricerca di alcune classi di contaminanti, almeno con quelle finora analizzate.

L'utilizzo di test con end point genetici diversi permette di ampliare le informazioni sui possibili danni al DNA provocati dal PM, risultando un utile strumento per verificarne in modo più completo l'eventuale genotossicità, e quindi pericolosità per la popolazione esposta. Questo emerge anche dai risultati ottenuti in questa campagna di monitoraggio in quanto i due tipi di test utilizzati evidenziano la presenza di sostanze che contribuiscono in modo diverso alla genotossicità del PM prelevato nei due siti. I risultati indicano un inquinamento diffuso, dovuto, probabilmente, al contributo di più sorgenti, che incidono in modo diverso a Villa Fulvia e a Cassana.

Si riporta l'indirizzo del sito web del Laboratorio Tematico "Mutagenesi Ambientale" dove sono pubblicati i dati relativi alla mutagenicità del particolato atmosferico urbano campionato nei nodi della rete regionale di monitoraggio della mutagenicità del particolato atmosferico urbano:

**<http://www.arpa.emr.it/mutagenesi>**

**Responsabile Laboratorio Tematico  
Mutagenesi Ambientale  
Dott.ssa Francesca Cassoni**