

Parma, 22 novembre 2019

**MONITORAGGIO DELLA MUTAGENICITÀ DEL  
PARTICOLATO ATMOSFERICO URBANO:  
RETE REGIONALE DELL'EMILIA-ROMAGNA  
PERIODO 2016 – 2018**

Test eseguiti presso il Laboratorio di Geno-tossicologia Umana, Microbica e Vegetale del Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale (SCVSA) dell'Università degli studi di Parma.

**Responsabile:**

**Annamaria Buschini**

***Team Università degli Studi di Parma***

**Serena Galati, Serena Montalbano, Veronica Mutti**

**per conto del Laboratorio Tematico Mutagenesi Ambientale**

**Francesca Cassoni, Clara Bocchi**

**Collaborazioni UniPR:**

Giorgio Pelosi, Franco Bisceglie, Marianna Pioli, Nicolò Orsoni, Beatrice Bonati del laboratorio di Chimica Bioinorganica, per la preparazione dei campioni.

**Network Team Arpae Emilia-Romagna**

Callegari A, Lodigiani A, Bottazzi M, Eleuteri A (Piacenza); Cassoni F, Bocchi C, Concari T, Pinto G (Parma); Volta C, Trepiccione M (Bologna); Canossa E, Mingozzi MR, Tosi M (Ferrara); Zamagni M, Bernardi F, Para C, Foscoli D, Rovere C, Sartini R (ARPA-Rimini).

**Collaborazioni Arpae:**

Ivan Scaroni, Alberto Santolini, Patrizia Casali di Arpa Emilia-Romagna, Sezione di Ravenna, Polo Analitico Regionale Microinquinanti Organici, per l'Analisi in gas-massa degli IPA e loro derivati.

**INDICE**

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<hr/>	
<b>MATERIALI E METODI</b>	
<i>Campionamento del particolato atmosferico</i>	<b>2</b>
<i>Estrazione particolato atmosferico</i>	<b>2</b>
<i>Determinazione Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) e derivati</i>	<b>3</b>
<i>Test di reversione batterica su Salmonella</i>	<b>4</b>
<i>Test della Cometa</i>	<b>5</b>
<i>Valutazione e rappresentazione dei dati</i>	<b>6</b>
<hr/>	
<b>RISULTATI</b>	
<i>Test di reversione batterica su Salmonella</i>	<b>7</b>
<i>Test della Cometa</i>	<b>14</b>
<hr/>	
<b>CONCLUSIONI</b>	<b>15</b>
<hr/>	

## INTRODUZIONE

L'attività della rete regionale di monitoraggio della mutagenicità del particolato atmosferico urbano (Particulate Matter - PM), gestita da Arpae Emilia-Romagna, iniziò già nel 1997 con il monitoraggio delle Polveri Totali Sospese (PTS), proseguendo dal 2000 con il monitoraggio della frazione PM<sub>2,5</sub> (particelle con diametro aerodinamico  $\leq 2,5 \mu\text{m}$ ).

Da gennaio 2008 i nodi coinvolti nell'attività della rete sono Piacenza, Parma, Bologna, Ferrara e Rimini e le centraline di campionamento del PM sono collocate in siti definiti di fondo urbano parco. In Tabella 1 si riportano le stazioni di prelievo della frazione PM<sub>2,5</sub> dell'attuale rete regionale.

Sul particolato vengono effettuati due test di mutagenesi, entrambi ampiamente usati in campo ambientale, in grado di evidenziare differenti tipi di danno al DNA: il test di reversione batterica che rileva mutazioni puntiformi nel batterio Salmonella e il test della Cometa che evidenzia rotture sia a singolo che a doppio filamento del DNA in cellule umane (linea cellulare umana A549).

I mesi in cui il particolato atmosferico viene campionato per i test di mutagenesi sono: gennaio e febbraio, rappresentativi dell'inverno, luglio, come mese estivo e novembre e dicembre, come mesi autunnali. Su tutti i campioni viene eseguito il test di reversione batterica su Salmonella, mentre il test della Cometa viene effettuato sul particolato prelevato in gennaio, luglio e novembre.

In seguito alla decisione della Direzione Generale di Arpae di interrompere l'attività analitica del Laboratorio Tematico Mutagenesi Ambientale, a partire dal 2016 è stato stipulato un Accordo di Collaborazione e Ricerca con il laboratorio di Geno-Tossicologia Umana, Microbica e Vegetale del Dipartimento di Bioscienze dell'Università di Parma, ora Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale. Contestualmente alla stipula dell'Accordo di Collaborazione e Ricerca, sono stati concordati i protocolli relativi alla preparazione dei campioni e all'esecuzione dei test di genotossicità.

In questo report si riportano i dati relativi al triennio 2016 – 2018, in cui l'attività analitica è stata interamente svolta presso l'Università degli Studi di Parma.

**Tabella 1** - Siti di campionamento della rete regionale di genotossicità del particolato atmosferico urbano.

<i>Città</i>	<i>Sito di Campionamento</i>	<i>Coordinate</i>	<i>Residenti per comune *</i>
Piacenza	Parco Montecucco	UTMX 552589 UTMY 4987424	103.362
Parma	Parco Cittadella	UTMX 605350 UTMY 4960980	194.934
Bologna	Giardini Margherita	UTMX 686389 UTMY 4930344	389.261
Ferrara	Villa Fulvia	UTMX 709478 UTMY 4966936	132.921
Rimini	Parco Marecchia	UTMX 774209 UTMY 4879200	150.007

\* Popolazione residente al 1° gennaio 2018 (<http://www.regione.emilia-romagna.it>)

## MATERIALI E METODI

### *Campionamento del particolato atmosferico*

Il particolato con diametro aerodinamico  $\leq 2,5 \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2,5}$ ) è raccolto su filtri in fibra di vetro tramite un campionatore sequenziale (campionatore e misuratore di polveri in atmosfera SWAM 5A Monitor – FAI Instruments s.r.l.). Il campionamento è continuo per tutte le 24 ore con un flusso di aspirazione di circa  $2,3 \text{ m}^3/\text{ora}$ . La concentrazione giornaliera delle polveri ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) viene determinata automaticamente dal campionatore. Il campione mensile è formato dall'insieme dei filtri giornalieri.

Le attività di campionamento e di invio dei filtri mensili alla Sezione di Parma sono state effettuate dal personale dei singoli nodi della rete regionale (vedi Network Team).

### *Estrazione particolato atmosferico*

Il campione mensile, formato dall'insieme dei filtri giornalieri, viene estratto tramite apparato Soxhlet in acetone. Il solvente viene evaporato sotto cappa ed il residuo secco è risospeso in dimetilsolfossido (DMSO) ad una concentrazione finale di  $50 \text{ m}^3/\text{ml}$  per l'esecuzione del test su Salmonella e di  $1000 \text{ m}^3/\text{ml}$  per il test della Cometa.

Tutte le fasi di pretrattamento del campione dall'estrazione chimica alla suddivisione in aliquote destinate alla determinazione dei microinquinanti organici e ai test di genotossicità, sono state affidate dalla Responsabile del laboratorio di Geno-Tossicologia Umana, Microbica e Vegetale al laboratorio di Chimica Bioinorganica appartenente allo stesso Dipartimento (SCVSA) dell'Università degli Studi di Parma.

### ***Determinazione Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) e derivati***

La determinazione degli IPA e dei loro derivati (Nitro-IPA e Ossi-Ipa) è stata effettuata presso la Sezione di Ravenna, nell'ambito delle attività del Polo Analitico Regionale Microinquinanti Organici, negli stessi estratti di particolato (PM<sub>2,5</sub>) da sottoporre a test di mutagenesi.

L'aliquota degli estratti organici viene 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 avviene in un'unica frazione con una miscela esano/diclorometano 50:50.

La determinazione analitica finale degli IPA viene 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 (Mi)<sup>+</sup> e ai picchi isotopici (Mi+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) 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 viene effettuata per gascromatografia ad alta risoluzione interfacciata ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo HRGC/MS/MS, attraverso la registrazione e la misura delle correnti ioniche relative ai picchi degli ioni figlio ottenuti dalla reazione di collisione con Argon.

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, 1,6-dinitropirene e 1,8-dinitropirene e 3-nitrobenzantrone.

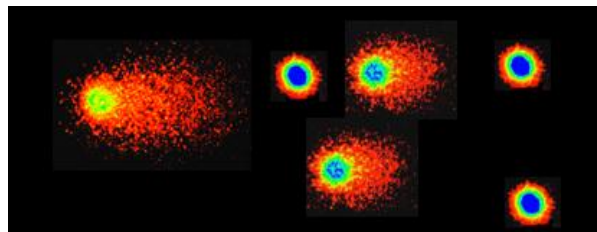
### **Test di reversione batterica su *Salmonella***

Gli estratti di particolato atmosferico sono stati sottoposti a test di reversione batterica sui 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 si utilizzano ceppi di batteri recanti differenti mutazioni a livello di poche coppie di basi nel DNA (mutazioni puntiformi) nel gene per la sintesi dell'istidina. Queste mutazioni rendono i batteri incapaci di crescere senza questo aminoacido, la positività del test viene valutata sul numero dei batteri che, in seguito ad una seconda mutazione dovuta all'esposizione a sostanze genotossiche, riacquistano la capacità di crescere in assenza di istidina (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: 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 derivati degli IPA, tutti i test su *Salmonella* 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 si saggiano tre concentrazioni: 2, 4 e 8 metri cubi di aria equivalenti, in triplice replica. Per ogni test (TA98 con, TA98 senza, TA100 con, TA100 senza attivazione metabolica) vengono contate le colonie di revertenti dopo 48 ore di incubazione delle piastre in termostato a +37°C.

### **Test della Cometa**

Il Test della Cometa evidenzia rotture del DNA a singolo e a doppio filamento, rilevando un danno primario nelle singole cellule che non è stato ancora fissato e che quindi potrebbe essere riparato. Il test della Cometa è stato effettuato sulla linea cellulare umana A549, costituita da cellule di epitelio alveolare ottenute da carcinoma polmonare umano. Il test viene eseguito in accordo con il metodo di Singh et al. (Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 1988; 175: 184-191): le cellule vengono messe a contatto con concentrazioni scalari di estratto di particolato atmosferico per 24 ore a +37°C e in atmosfera arricchita al 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo l'incubazione le membrane cellulari e nucleari vengono lisate e il DNA viene sottoposto a corsa elettroforetica su vetrino in tampone fortemente alcalino (pH>13). I vetrini sono, 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 (in cui il DNA non è danneggiato) e di coda (formata dai frammenti di DNA rotti e migrati), la cui lunghezza e intensità luminosa sono proporzionali alla quantità di DNA migrato nella corsa elettroforetica e quindi al danno subito dalle cellule. Vengono saggiate 3 dosi in doppia replica corrispondenti a 2.5 - 5 e 10 metri cubi di aria equivalenti.

**Figura 1** - DNA da singola cellula, integro e a diversi livelli di danno, visualizzato al termine del test (immagine elaborata con software Comet assay IV, Perceptive Instruments,UK).



## ***Valutazione e rappresentazione dei dati***

### Test su Salmonella

Per stabilire la positività (mutagenicità) dei campioni di particolato si è applicato il criterio del raddoppio: un campione si considera positivo quando il rapporto tra il numero dei revertenti indotti dal campione e il numero dei revertenti spontanei (controllo negativo) è maggiore o uguale a due (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 il numero dei revertenti per metro cubo di aria è rappresentato dal coefficiente angolare della retta di regressione dose - effetto, considerandone solo il tratto lineare al fine di eliminare l'interferenza dovuta all'eventuale presenza di effetto tossico o di altri effetti inibenti. In questo studio si sono presi in considerazione solo i coefficienti angolare delle rette di regressione dose-effetto dei campioni positivi e di quelli che presentavano un  $R^2 \geq 0,60$ .

Per rappresentare l'effetto mutageno indotto nei quattro test su Salmonella è stato utilizzato un indice, il Fattore di Genotossicità (FG), che si ottiene sommando i quattro valori ottenuti dal rapporto tra il trattato sul rispettivo controllo (Rossi C, Poli P, Buschini A, Campanini N, Vettori MV, Cassoni F. Persistence of genotoxicity in the area surrounding an incineration plant. *Toxicol Environ Chem* 1992; 36: 75-87).

### Test della cometa

Il danno al DNA viene misurato mediante sistema computerizzato di analisi dell'immagine (Comet assay IV). L'effetto genotossico del campione viene espresso come percentuale di intensità di fluorescenza del DNA nella coda della cometa (Tail Intensity - TI%), parametro raccomandato in letteratura, che calcola la quantità di DNA migrato, rispetto a quello rimasto integro nel nucleo. Per ogni dose vengono misurate duecento cellule (100 cellule in ciascuna replica). Il potenziale effetto tossico degli estratti è valutato subito dopo il trattamento come riduzione della vitalità cellulare, utilizzando il Trypan blue: un campione viene definito tossico quando la mortalità cellulare supera il 30%; in questo caso la dose in oggetto viene definita "tossica" e non ne viene quantificata la genotossicità. Inoltre, durante la fase di lettura, viene valutata la percentuale di cellule "hedgehogs" (letteralmente porcospino) ovvero cellule fortemente danneggiate che



presentano nuclei completamente dispersi, in cui la coda è separata dalla testa della cometa, fra queste possono essere presenti cellule che hanno attivato processi attivi di “morte programmata” (apoptosi). La positività di un campione viene definita confrontando le mediane con il test “notched box-plot”, mentre il valore quantitativo del danno è dato dal coefficiente angolare delle rette di regressione dose-effetto dei campioni positivi e di quelli che presentano un  $R^2 \geq 0,60$ , eliminando le dosi che presentano effetto tossico.

### Analisi statistica

L'elaborazione dei dati è stata eseguita con il software gratuito PAST - Paleontological statistics software package for education and data analysis - 3.18 (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

I confronti fra le due condizioni (presenza e assenza di attivazione metabolica) nel test su Salmonella sono stati eseguiti con il t di Student per campioni appaiati; i confronti fra le città e le stagioni sono stati effettuati mediante analisi della varianza univariata (Anova) con test *post hoc* di Tukey; mentre è stata effettuata una correlazione fra le concentrazioni di polveri e quelle degli inquinanti chimici con l'attività mutagena. Tutti i test sono stati considerati statisticamente significativi quando il valore di p era inferiore a 0.05.

## **RISULTATI**

In seguito al riscontro di dati anomali dovuti ad una inadeguata procedura di preparazione del campione, i risultati dei test su tutti i campioni di gennaio e di febbraio 2017 sono stati invalidati.

### ***Test di reversione batterica su Salmonella***

In tutti i nodi della rete si conferma la stagionalità tipica dell'andamento della mutagenicità del particolato atmosferico rilevata con i test su Salmonella: con valori più elevati nei periodi autunnali e invernali rispetto a quelli estivi. Nella Tabella 2, che riporta i valori dei Fattori di Genotossicità (vedi *Valutazione e rappresentazione dei dati*) l'andamento stagionale è evidente, anche se nel 2016, in contrasto con le serie storiche precedenti, e successive, i campioni di luglio di Piacenza, Parma e Bologna sono risultati “debolmente positivi”.

Il valore di FG più alto di questo triennio è stato quello riscontrato in gennaio 2016 a Piacenza.

**Tabella 2** – Mutagenicità del particolato atmosferico urbano (PM<sub>2,5</sub>) rilevata come Fattore di Genotossicità - FG – nei test di reversione batterica su Salmonella (inv: dato invalidato).

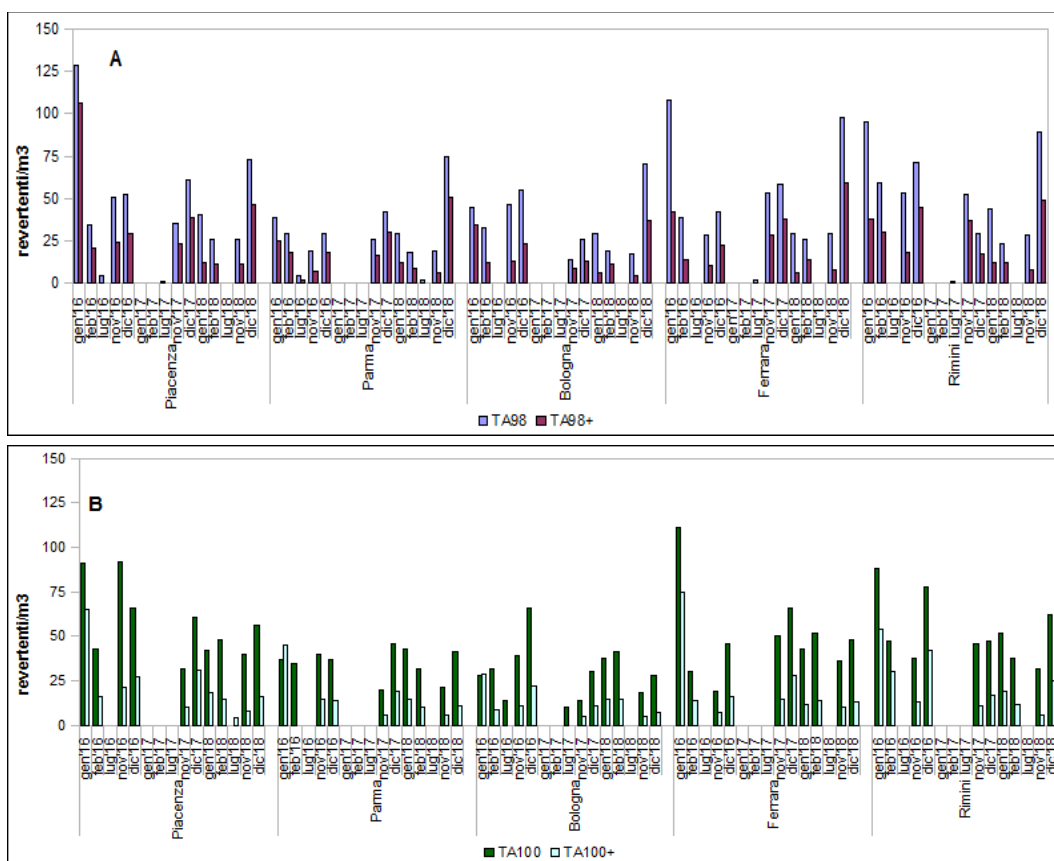
mese	PC	PR	BO	FE	RN
Gen16	112,4	33,7	39,3	69,4	61,9
Feb16	17,5	15,0	13,1	15,2	27,8
Lug16	2,3	2,2	1,5	1,1	0,9
Nov16	68,8	25,2	34,9	22,6	41,5
Dic16	48,0	27,4	48,0	27,1	67,7
Gen17	inv	inv	inv	inv	inv
Feb17	inv	inv	inv	inv	inv
Lug17	0,9	1,4	1,3	1,1	0,9
Nov17	17,2	11,7	7,2	24,6	26,3
Dic17	69,8	50,2	28,5	67,9	35,0
Gen18	32,8	26,4	22,3	22,7	35,4
Feb18	24,5	17,7	20,1	26,0	22,2
Lug18	0,6	1,1	0,5	0,7	0,8
Nov18	29,3	20,7	18,1	30,7	29,8
Dic18	35,4	34,1	27,9	42,8	41,6

Intervalli di positività	Giudizio
FG ≤ 1,4	negativo
1,5 ≤ FG ≤ 2,9	debolmente positivo
3,0 ≤ FG ≤ 14,9	positivo
FG ≥ 15,0	fortemente positivo

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 conferma, per tutto il periodo e in tutti i nodi della rete, una maggiore sensibilità nei test condotti in assenza di attivazione metabolica in entrambi i ceppi (t di Student,  $p < 0.05$ ), evidenziando una prevalenza di sostanze ad azione mutagena diretta (Fig. 2) cioè che agiscono sul DNA direttamente, senza essere prima metabolizzate.

Osservando nell'intera rete l'evoluzione temporale della mutagenicità, espressa come numero di revertenti indotti per metro cubo di aria (Fig. 2 A e B) si evidenzia, per entrambi i ceppi e le condizioni, un picco di mutagenicità nel gennaio del 2016. Anche il PM raccolto nei mesi di dicembre qui monitorati induce più revertenti rispetto agli altri mesi, ma solo sul ceppo TA98 (Anova, *post hoc* di Tukey,  $p < 0.05$ ).

**Figura 2** - Genotossicità del PM<sub>2,5</sub> espressa come numero medio di revertenti per metro cubo d'aria rilevata nelle stagioni e nei siti indicati, in *Salmonella typhimurium* ceppi TA98 (A) e TA100 (B) con (+) e senza attivazione metabolica esogena (gennaio e febbraio 2017 dati invalidati).



**N.B.** I risultati dei test di gennaio e febbraio 2017 sono stati invalidati.

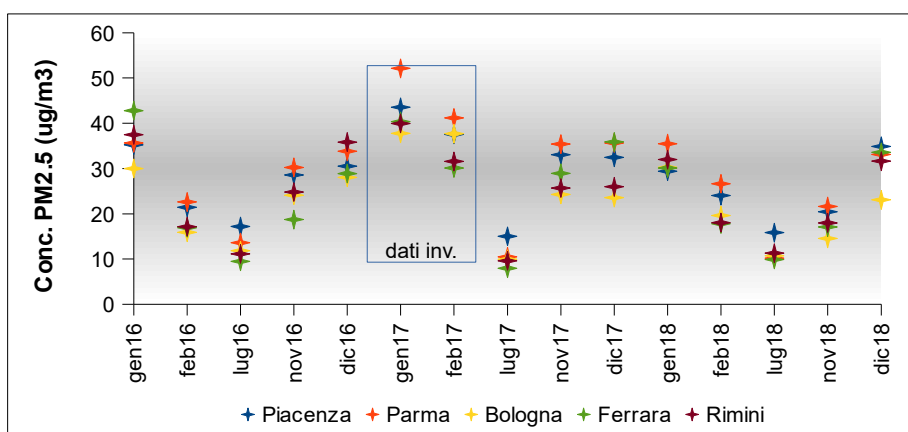
Come già evidenziato in precedenza, la diversità nel numero dei revertenti indotti per metro cubo di aria che si riscontra all'interno di uno stesso nodo in diversi periodi, come pure tra nodi nello stesso periodo, può essere dovuta sia ad una diversa concentrazione del PM<sub>2,5</sub> (Fig. 3) che ad una diversa attività mutagena specifica dello stesso, ma non sempre i due fattori incidono in egual misura.

Nel triennio monitorato non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa fra le concentrazioni di PM<sub>2,5</sub> e neppure fra la mutagenicità nelle diverse città, anche se nei grafici riportati in Figura 2 A e B sono evidenti le differenze di mutagenicità di Piacenza, Ferrara e Rimini, rispetto a Parma e Bologna.

Valutando l'evoluzione temporale delle polveri è emerso che in novembre 2017 e in tutti i mesi di dicembre e gennaio la concentrazione di PM<sub>2.5</sub> è maggiore rispetto agli altri mesi (Fig. 3).

Per completezza di informazione nella Figura 3 sono rappresentate anche le concentrazioni delle polveri misurate in gennaio e febbraio 2017, anche se i test su quei campioni sono stati successivamente invalidati.

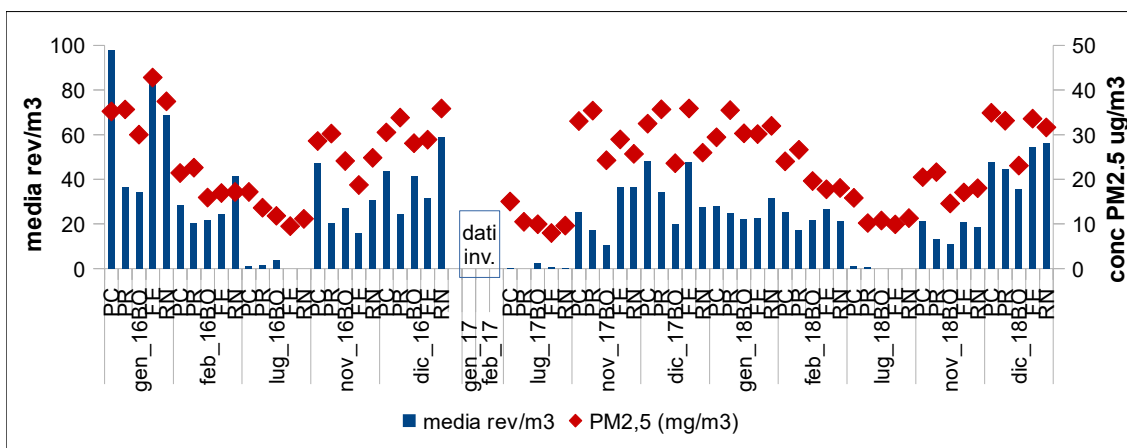
**Figura 3** - Concentrazioni medie mensili di particolato atmosferico PM<sub>2.5</sub> (µg/m<sup>3</sup>).



N.B. I risultati dei test di gennaio e febbraio 2017 sono stati successivamente invalidati.

Mettendo a confronto gli andamenti della mutagenità del PM<sub>2.5</sub> con la media delle sue concentrazioni mensili (Fig. 4), si evidenzia che l'andamento dei due parametri è simile, infatti i valori del coefficiente *r* di correlazione di Pearson variano fra 0,80 e 0,92. Tuttavia, non sempre a una maggiore concentrazione di PM<sub>2.5</sub> corrisponde un numero maggiore di revertenti indotti per metro cubo di aria, confermando la rilevanza anche della tipologia e della quantità relativa delle sostanze mutagene associate al PM.

**Figura 4** - Andamenti comparati della mutagenicità del PM<sub>2,5</sub>, (media mensile dei revertenti/m<sup>3</sup>) e delle concentrazioni delle polveri (µg/m<sup>3</sup>), nei siti indicati (dati inv: dati invalidati).

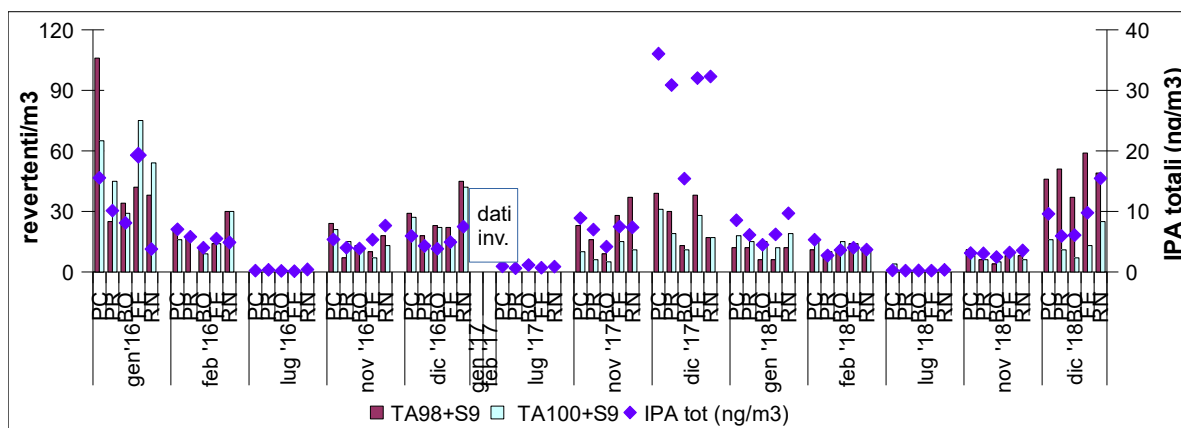


IPA

Nelle comparazione con i dati di mutagenicità, sono stati considerati solo gli IPA con attività biologica [Σ{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}]

Dal confronto tra le concentrazioni di IPA con il numero dei revertenti indotti nei test sensibili alla loro presenza (test con attivazione metabolica, +S9) si conferma che, pur avendo lo stesso andamento stagionale, le concentrazioni più alte di IPA non sempre corrispondono all'attività mutagena più alta del PM, questo è particolarmente evidente in gennaio 2016 e in dicembre 2017 (Fig. 5).

**Figura 5** - Confronto tra livelli mensili degli IPA mutageni (ng/m<sup>3</sup>), riportati nel testo, e attività genotossica (rev/m<sup>3</sup>) ottenuta con i test sui ceppi TA98 e TA100 con attivazione metabolica (+S9) (dati inv: dati invalidati).



In tabella 3 si riportano i valori i coefficienti *r* di correlazione di Pearson, ottenuti mettendo in relazione la concentrazione di IPA con la media dei revertenti riscontrati nei test più sensibili alla loro presenza. Questi valori variano nelle diverse città: a Rimini, ad esempio, il coefficiente di Pearson è negativo, e in nessun nodo la correlazione è statisticamente significativa, confermando un forte contributo alla mutagenicità da parte di altre sostanze.

**Tabella 3** - Valori dei coefficienti di correlazione di Pearson ottenuti mettendo in relazione la concentrazione di IPA (ng/m<sup>3</sup>) con il numero di revertenti/m<sup>3</sup> di aria equivalente, indotti in seguito ad attivazione metabolica esogena (+S9).

**Coefficiente di correlazione**

	TA98+S9	TA100+S9
<b>Piacenza</b>	0.39	0.44
<b>Parma</b>	0.38	0.31
<b>Bologna</b>	0.24	0.16
<b>Ferrara</b>	0.57	0.58
<b>Rimini</b>	-0.01	-0.14

Verificando le variazioni di concentrazione di IPA totali nel triennio (ng/m<sup>3</sup> di aria equivalente) si riscontra che questi sono maggiormente associati alle polveri campionate in autunno ed in inverno, rispetto a quelle estive. In particolare è evidente un picco in dicembre del 2017 (Anova, *post hoc* di Tukey *p*<0.05).

Non si riscontrano differenze statisticamente significative fra le concentrazioni riscontrate nelle città.

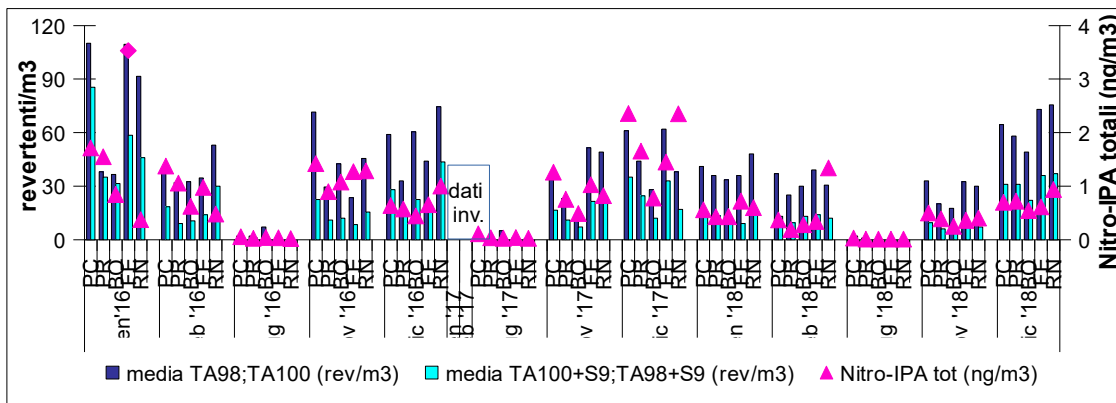
Nitro-IPA

I derivati degli IPA rilevati sono descritti al paragrafo “Determinazione Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) e derivati”.

Come per gli IPA, non si riscontra una differenza statisticamente significativa fra le concentrazioni di Nitro-IPA (ng/m<sup>3</sup> di aria equivalente) rilevate nelle città e anche queste sostanze si ritrovano principalmente nel PM campionato in autunno ed in inverno, rispetto a quello estivo. In particolare i Nitro-IPA risultano maggiormente associati alle polveri campionate in gennaio 2016 e in dicembre 2017 (Anova, *post hoc* di Tukey p<0.05).

In Figura 6 si riporta il grafico relativo al confronto tra le concentrazioni mensili di derivati degli IPA con l'attività mutagena 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. Qui viene riportata la media sia dei revertenti diretti che di quelli indiretti, in quanto i Nitro-IPA agiscono direttamente sul DNA, ma, una volta penetrati nell'organismo, possono essere metabolizzati ed agire sul DNA anche direttamente, sotto forma di IPA.

**Figura 6** - Confronto tra le concentrazioni mensili dei Nitro-IPA (ng/m<sup>3</sup>) riportati nel testo, compreso il 3-nitrobenzantrene, e attività genotossica (rev/m<sup>3</sup>) ottenuta con i test sui ceppi TA98 e TA100 con (+S9) e senza attivazione metabolica (dati inv: dati invalidati).



Anche in questo caso, non sempre c'è corrispondenza tra la maggiore attività mutagena e la maggiore concentrazione di Nitro-IPA, come evidenziato dai valori di coefficienti  $r$  di correlazione di Pearson, ottenuti mettendo in relazione la loro concentrazione con la media dei revertenti in entrambe le condizioni, che variano da valori negativi (Piacenza) fino all'ottima correlazione riscontrata a Ferrara e, in minor misura, a Bologna (Tab. 4).

**Tabella 4** - Valori dei coefficienti di correlazione di Pearson ottenuti mettendo in relazione la concentrazione di Nitro-IPA ( $\text{ng}/\text{m}^3$ ) con il numero medio di revertenti/ $\text{m}^3$  di aria equivalente, indotti sia in assenza (-S9) che in presenza di attivazione metabolica esogena (+S9).

Coefficiente di correlazione		
città/condizione	-S9	+S9
Piacenza	-0.01	-0.07
Parma	0.43	0.56
Bologna	0.65	0.65
Ferrara	0.83	0.85
Rimini	0.33	0.27

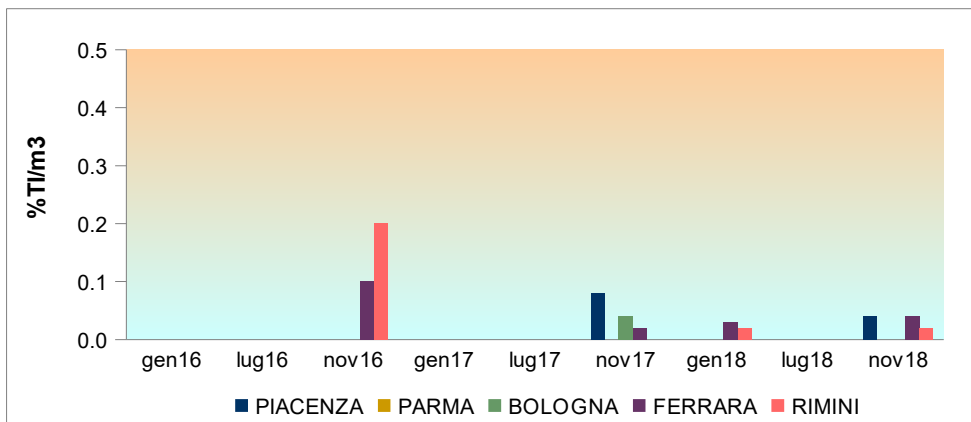
### **Test della Cometa**

Nel triennio 2016 - 2018 nessun campione testato ha indotto un danno significativo al DNA o è risultato tossico sulle cellule utilizzate.

In Figura 7 vengono riportati i valori del danno indotto per metro cubo di aria espresso come percentuale di DNA nella coda, ricavati dai coefficienti angolari delle rette di regressione dose/effetto che presentavano un  $R^2 \geq 0,60$ .



**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 con  $R^2 \geq 0.6$ .



## CONCLUSIONI

Si conferma la stagionalità della mutagenicità, già riscontrata negli anni precedenti, rilevata dai test su Salmonella con valori più alti nei mesi più freddi e valori più bassi nel periodo estivo; mentre tutti i test della Cometa sulle cellule A549, eseguiti nel triennio, sono risultati negativi.

Confrontando la quantità di particolato, gli inquinanti ad esso adesi e la sua mutagenicità su Salmonella, non sono emerse differenze statisticamente significative fra i nodi della rete.

Nel periodo qui riportato i valori di mutagenicità più elevati si osservano in gennaio 2016, seguito, in minor misura, dai tre mesi di dicembre monitorati (dicembre 2016, 2017 e 2018). Le differenze nel livello della mutagenicità (numero di revertenti indotti per metro cubo di aria) possono essere dovute sia ad una maggiore concentrazione del  $PM_{2,5}$  (microgrammi per metro cubo di aria), che ad una maggiore attività mutagena specifica dello stesso. Infatti, pur in assenza di differenza significativa, si nota che la concentrazione di PM raccolto a Parma è fra le più alte della rete e la sua mutagenicità è fra le minori. Ciò sottolinea che, a volte, hanno maggior rilevanza la tipologia e le quantità relative delle sostanze mutagene associate al PM rispetto alla sua misura fisica in atmosfera.

Dai dati relativi al confronto tra IPA e attività mutagena del particolato si evidenzia la stessa stagionalità con i test su Salmonella, ma si conferma la discrepanza tra le concentrazioni più alte di

IPA e i valori più alti di revertenti indotti, dimostrando che questa classe di composti incide solo in parte sulla mutagenicità del PM. Anche per i derivati degli IPA (Nitro-IPA) non si riscontra sempre corrispondenza tra la maggiore attività mutagena e la loro concentrazione.

Come già sottolineato più volte nei precedenti report, l'effetto biologico delle miscele complesse, quale è il particolato atmosferico, non viene completamente spiegato con le classi di contaminanti analizzate. Inoltre, anche se fosse possibile caratterizzare e/o quantificare tutte le diverse specie chimiche che compongono il particolato, si perderebbero gli effetti additivi, sinergici e/o antagonisti delle sostanze presenti in atmosfera.

Il monitoraggio continuo nel tempo, e su tutta la regione, della genotossicità del particolato atmosferico urbano ha fornito, negli anni, importanti informazioni sia ai fini della prevenzione primaria, con una migliore caratterizzazione del pericolo per la popolazione urbana cronicamente esposta, sia nella valutazione dell'efficacia delle azioni nazionali e locali tese al risanamento dell'aria.

***a cura di Clara Bocchi***

***Area Prevenzione Ambientale Ovest – SSA Parma***