

Parma, 08 giugno 2011  
Prot. n.: PGPR/2011/6678

**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 2010 – febbraio 2011**

Nella presente relazione tecnica si riportano i risultati relativi al primo anno di monitoraggio della genotossicità del PM<sub>2,5</sub> campionato nel sito di Cassana nel periodo luglio 2010 – febbraio 2011. 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*.

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, era costituito dall'insieme di tutti i filtri giornalieri dell'intero mese di campionamento.

I campioni di PM<sub>2,5</sub> 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 m<sup>3</sup>/ml per l'esecuzione del test su Salmonella e di 200 m<sup>3</sup>/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<sub>2,5</sub>) 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 (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 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 ( $M_i^-$ ) e ai picchi isotopici ( $M_i+1^-$ ).

Nitro-IPA rilevati: 1-nitronaftalene, 2-nitronaftalene, 2-nitrofluorene, 2-nitro+3-nitro fluorantene, 9-nitroantracene, 9-nitrofenantrene, 1-nitropirene, 7-nitrobenzo(a)antracene, 6-nitrocrisene, 6-nitrobenzo(a)pirene, 3-nitrobenzantrone. **Il 2-nitrofluorene è stato riportato solo per il mese di luglio 2010, i dati, a partire da novembre 2010, non sono stati elaborati in quanto il composto risulta interferito (probabilmente altri isomeri non ancora identificati).**

## **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 dei due ceppi di *Salmonella typhimurium* permette di evidenziare diversi tipi di danni genetici 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.

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. 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, a parte quelli di luglio 2009 in cui è stata saggiata anche una dose intermedia, sono state saggiate 3 dosi, con due repliche ciascuna.

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.

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata con pacchetto statistico SPSS.

### ***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%), 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 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<sup>3</sup>) è dato dal coefficiente angolare delle rette di regressione dose-effetto dei campioni positivi e di quelli che presentano, comunque, un  $R^2 \geq 0,60$ .

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata con pacchetto statistico SPSS.

## **Risultati**

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

Le concentrazioni di PM<sub>2,5</sub> saggiate su Salmonella sono state 2 - 4 - 8 m<sup>3</sup> di aria equivalenti. I campioni prelevati in luglio 2010 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° 46631 e 46632). I campioni prelevati in entrambi i siti, nei mesi di novembre e dicembre 2010 e di gennaio e febbraio 2011, sono risultati positivi in tutti i test su Salmonella (rapporto trattato/controllo  $\geq 2$  - vedi rapporti di Prova n° 67074, 1916, 67075, 1918, 8682, 12320, 12319, 12321). Occorre precisare 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)). 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.1 e 2, Fig.1A,B).

Confrontando la mutagenicità del PM prelevato nei due siti, valutata come numero di revertenti per microgrammo di particolato (Tab.2, Fig.1B), 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.1, Fig.1A). Questa discrepanza è spiegata dal fatto che a Villa Fulvia, rispetto a Cassana, è presente una minore quantità di particolato ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) (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.2).

L'evoluzione temporale della mutagenicità del particolato atmosferico, espressa come media dei revertenti/m<sup>3</sup>, è confrontabile con l'andamento delle concentrazioni medie mensili (µg/m<sup>3</sup>) delle polveri (Fig.2) per entrambi i siti di campionamento; infatti le rette di regressione presentano un R<sup>2</sup> di 0,8 che andrà comunque confermato con un maggior numero di dati.

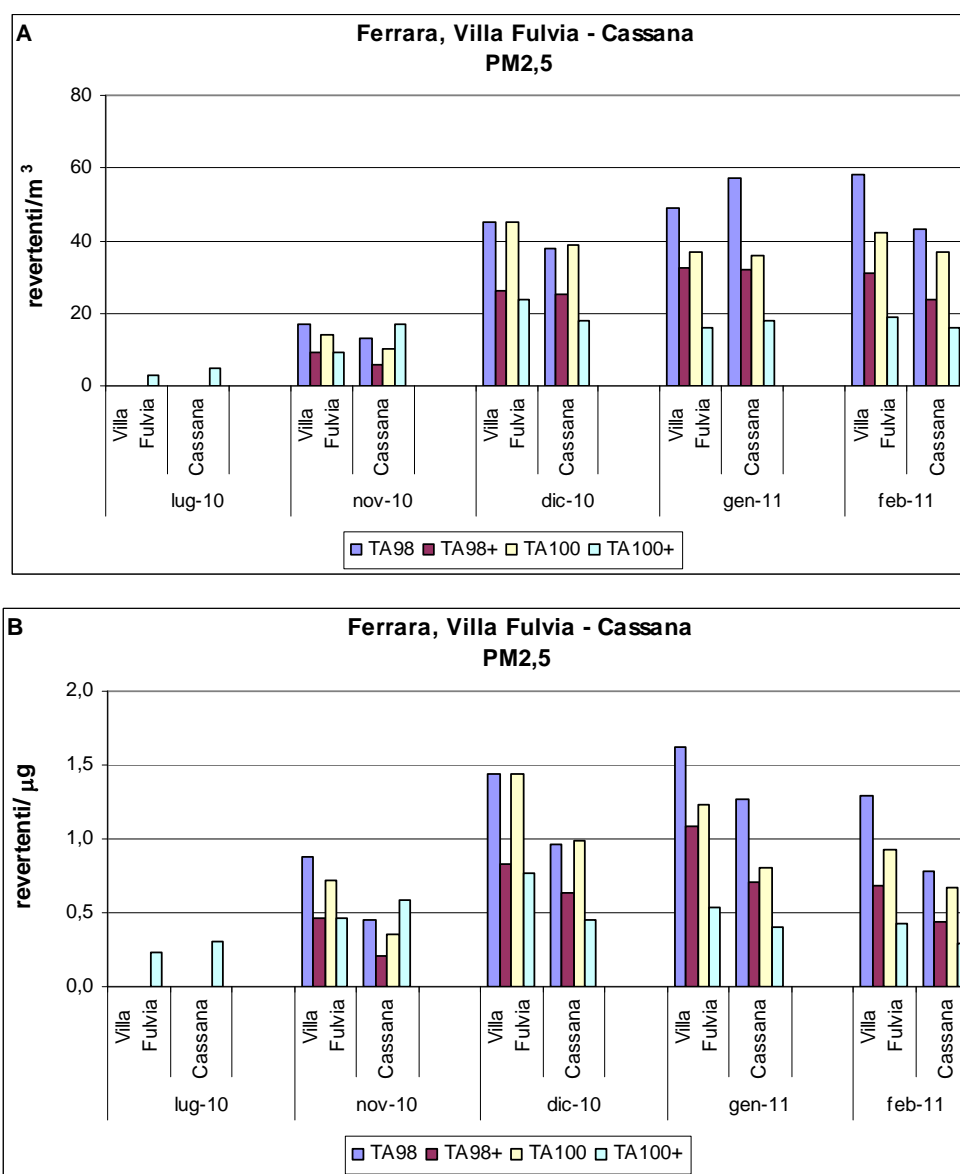
**Tabella 1 - Valori dei revertenti/m<sup>3</sup> calcolati dalla retta di regressione dose/effetto, in tutti i test eseguiti sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* con (+) e senza attivazione metabolica esogena, nei siti e nei periodi indicati.**

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

**Tabella 2 - 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.**

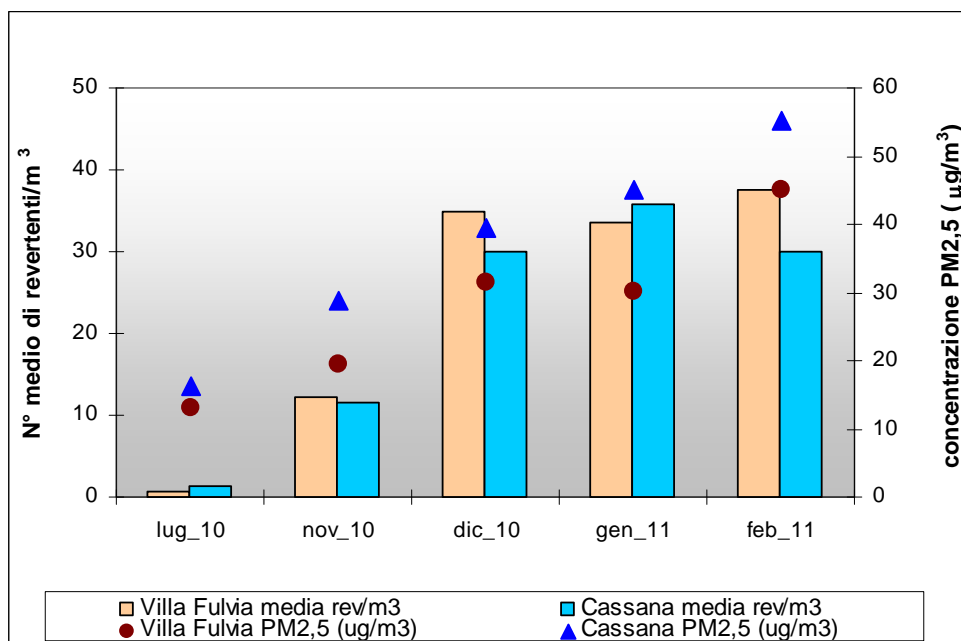
Periodo di campionamento PM2,5	Sito di campionamento	revertenti/µg			
		TA98	TA98+	TA100	TA100+
lug-10	V.Fulvia	0,000	0,000	0,000	0,229
	Cassana	0,000	0,000	0,000	0,306
nov-10	V.Fulvia	0,875	0,463	0,721	0,463
	Cassana	0,452	0,209	0,348	0,591
dic-10	V.Fulvia	1,434	0,829	1,434	0,765
	Cassana	0,965	0,635	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

**Figura 1 - 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.**



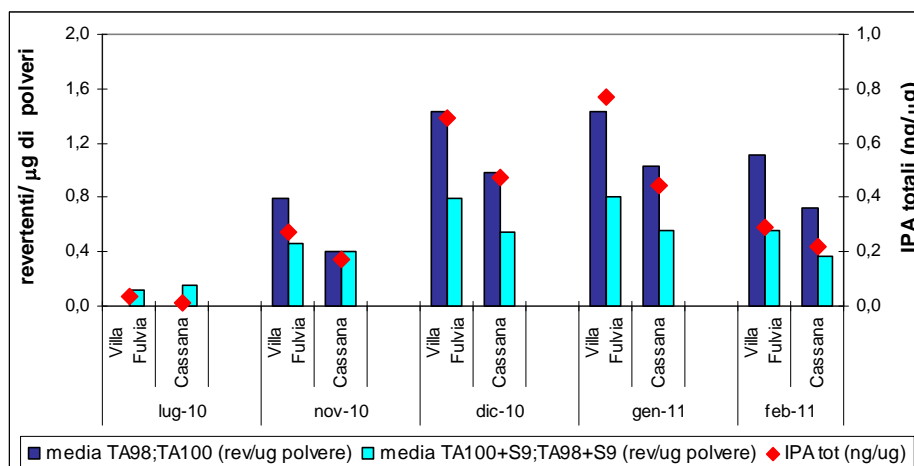


**Figura 2 - Andamenti comparati della mutagenicità del particolato atmosferico urbano, PM<sub>2,5</sub> (media dei revertenti/m<sup>3</sup> indotti da estratti di campioni mensili) e delle concentrazioni (medie mensili) delle polveri, nei periodi e nei siti indicati.**



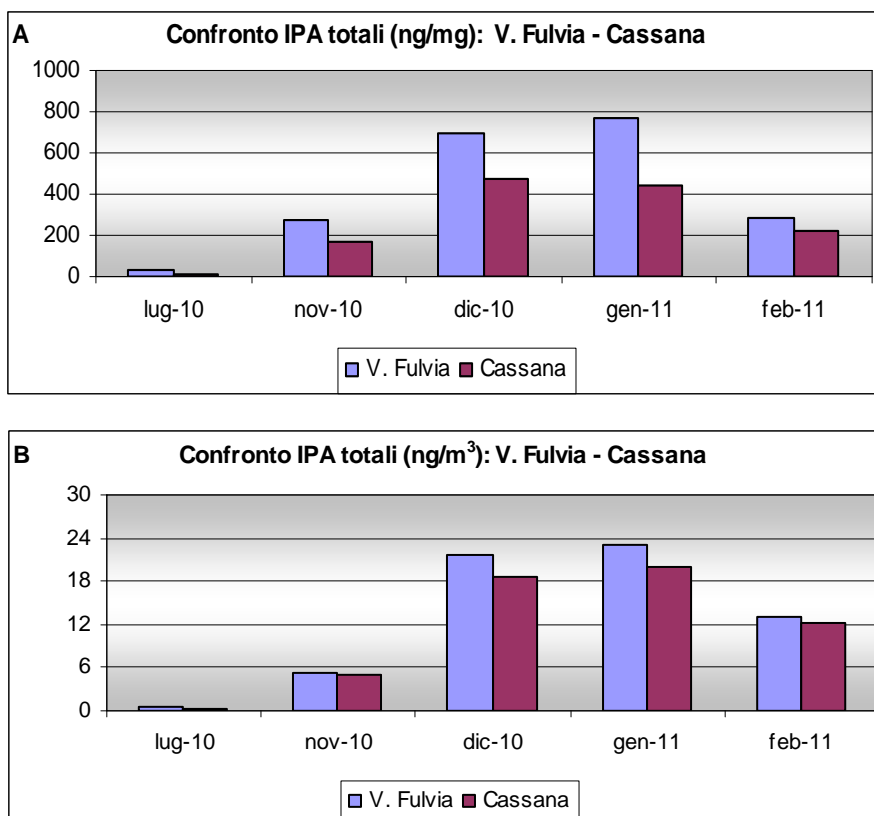
Per valutare il contributo degli IPA alla mutagenicità del PM sono state messe a confronto le concentrazioni medie di IPA, dotati di attività biologica (fluorantene, pirene, benzo(a)antracene, ciclopenta(cd)pirene, crisene, benzo (b) fluorantene, benzo (k) fluorantene, benzo (e) pirene, benzo (a) pirene, 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), 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. 3). Si evidenzia che, anche se non sempre esiste una corrispondenza assoluta, l'andamento delle concentrazioni di IPA segue quello dell'attività mutagena soprattutto quella rilevata con i test condotti in presenza di attivazione metabolica esogena, ricalcandone l'andamento stagionale.

**Figura 3- 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.**

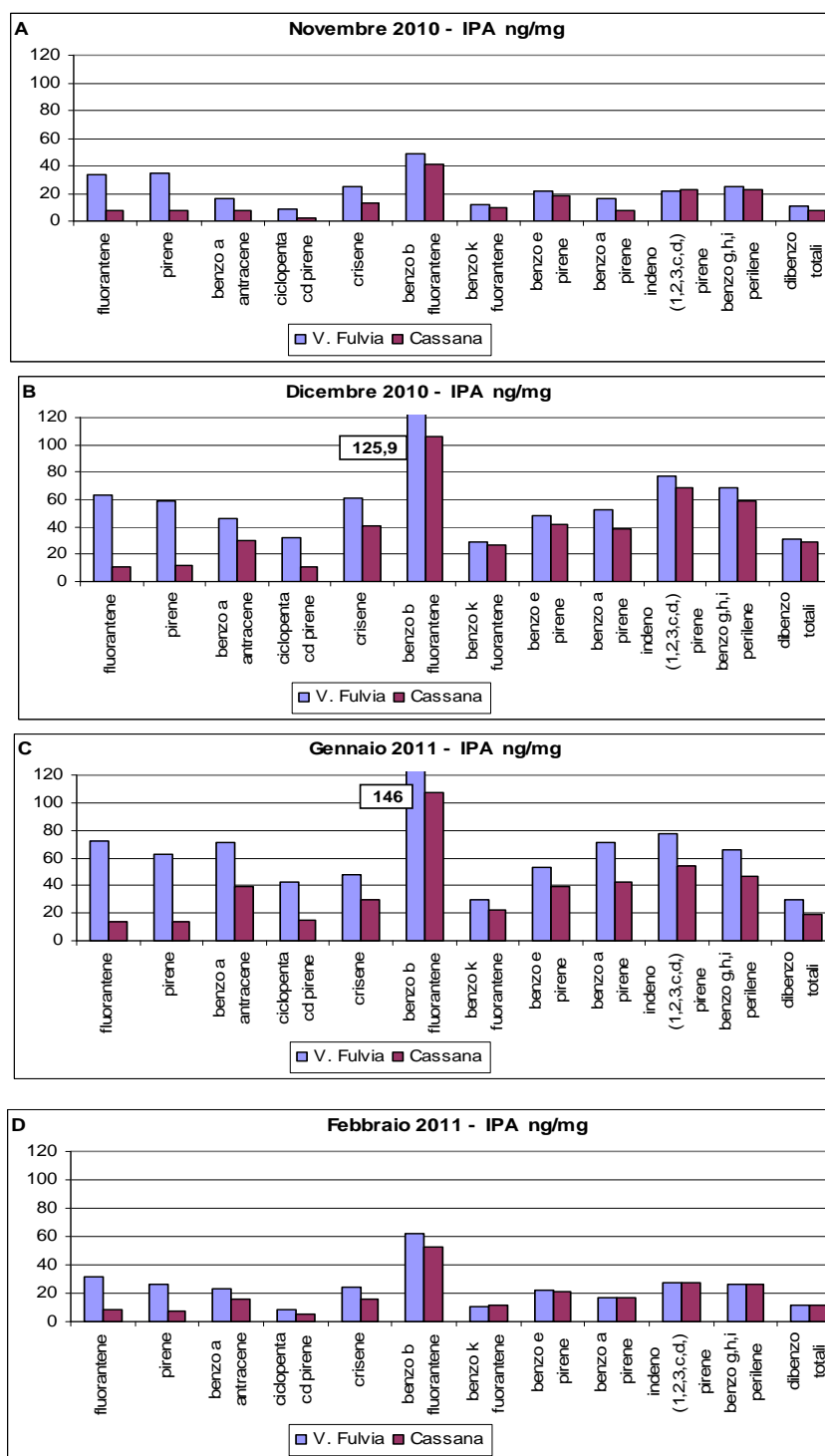


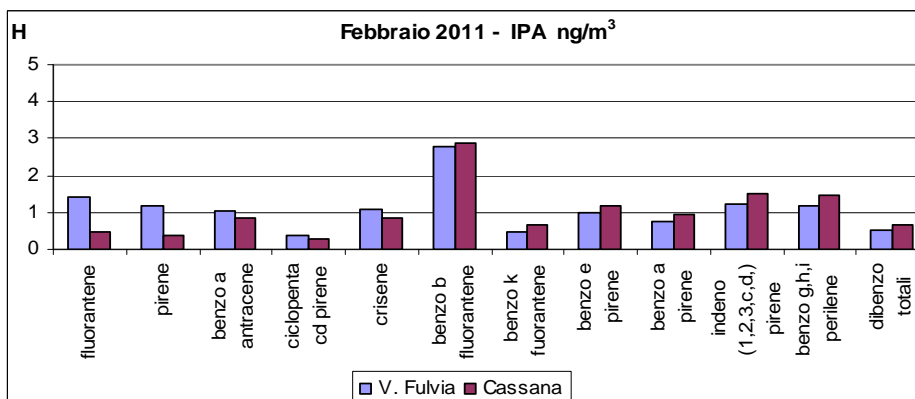
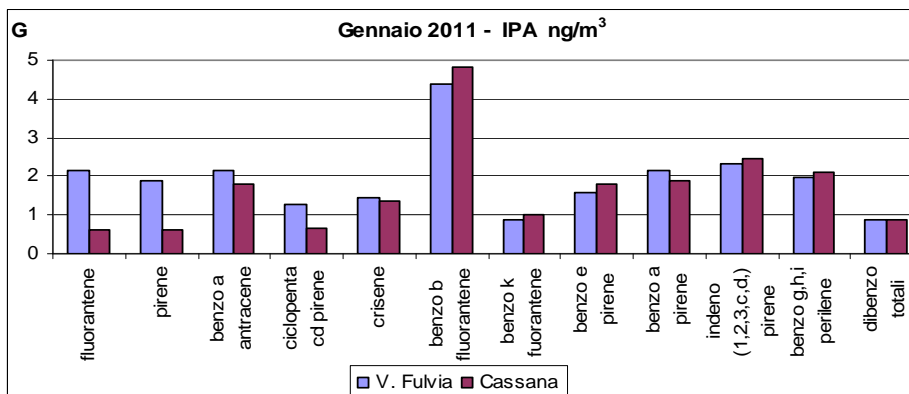
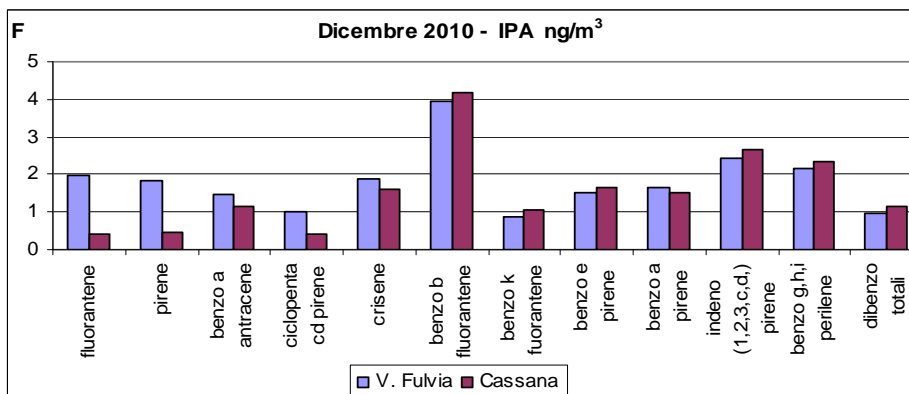
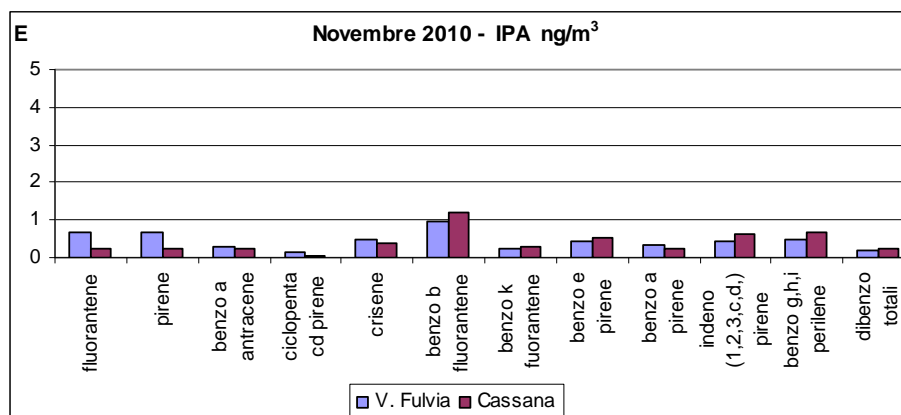
Nelle figure 4 e 5 si riportano le concentrazioni medie mensili di IPA totali e dei singoli IPA (di questi ultimi solo le concentrazioni rilevate nei mesi più freddi), espresse sia come ng/mg (Fig.4A, Fig.5A,B,C,D) che come ng/m<sup>3</sup> (Fig.4B, Fig.5E,F,G,H), rilevate a Villa Fulvia e a Cassana. I periodi dove si riscontrano le concentrazioni maggiori di IPA sono quelli più freddi, con differenze significative fra i valori di luglio rispetto agli altri (ANOVA, post hoc p<0.05). Confrontando le concentrazioni dei singoli IPA, fra i due siti, sia per milligrammo che per metro cubo di aria equivalente si osservano valori più alti a Villa Fulvia rispetto a Cassana (t di Student, p<0.05), confermando quanto sopra riportato sulla qualità del PM campionato a Villa Fulvia. Per quanto riguarda le concentrazioni dei singoli IPA (Fig.5), per entrambi i siti, il benzo(b)fluorantene tende ad avere valori più elevati rispetto agli altri.

**Figura 4- Concentrazioni totali degli IPA dotati di attività biologica (vedi testo), determinate negli stessi estratti di particolato atmosferico sottoposti a test di mutagenesi, espresse come ng/mg di particolato (A) e ng/m<sup>3</sup> (B), nei siti e nei mesi indicati.**



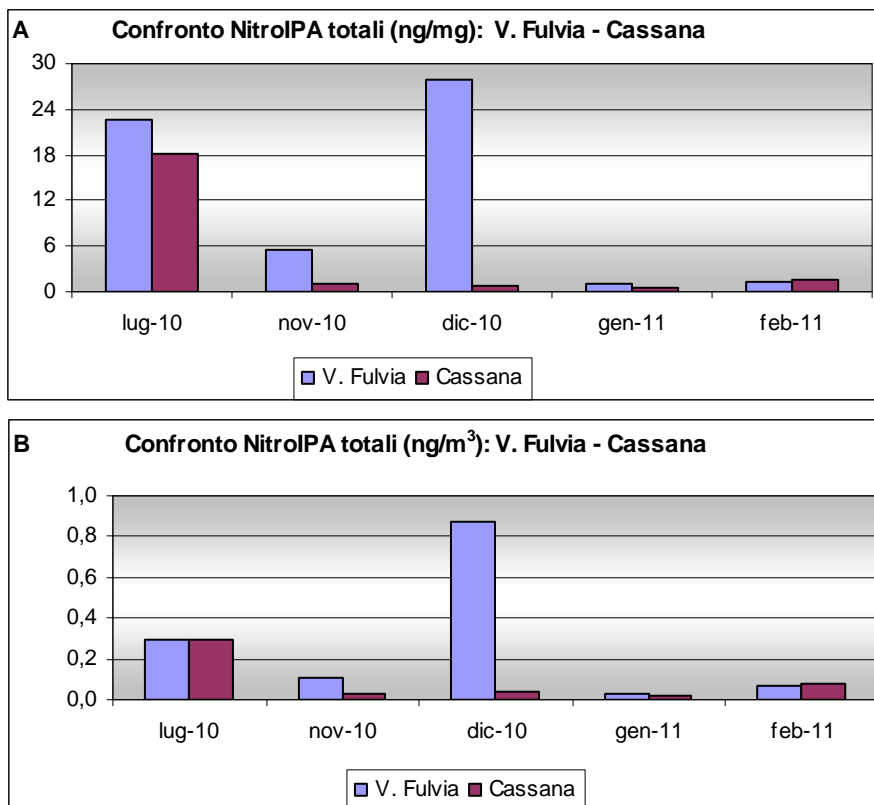
**Figura 5 - Concentrazioni medie mensili dei singoli IPA dotati di attività biologica determinate negli stessi estratti di particolato atmosferico sottoposti a test di mutagenesi, espresse come ng/mg di particolato (A,B,C,D) e ng/m<sup>3</sup> (E,F,G,H), nei mesi e nei siti indicati. Dibenzo totali =  $\Sigma$  dibenzo(a,h+a,c)antracene, dibenzo(a,l)pirene, dibenzo(a,e)fluorantene, dibenzo(a,e)pirene, dibenzo(a,i)pirene, dibenzo(a,h)pirene.**



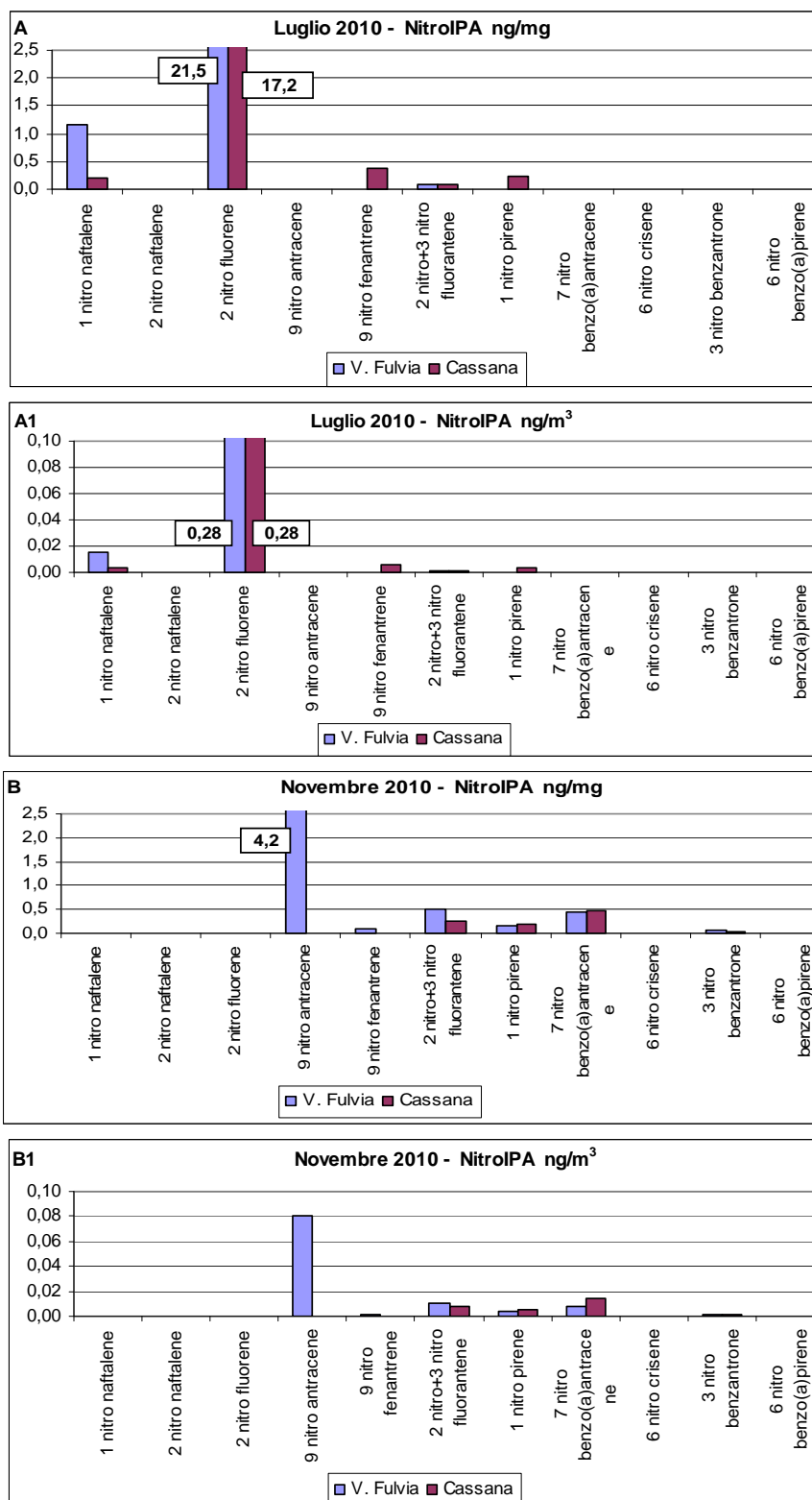


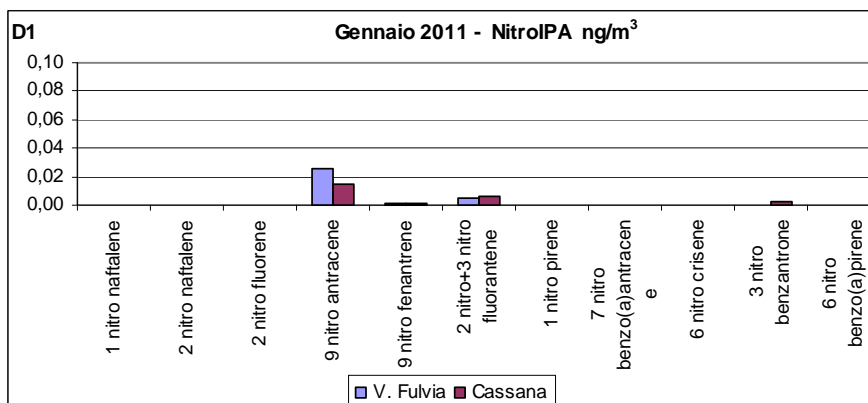
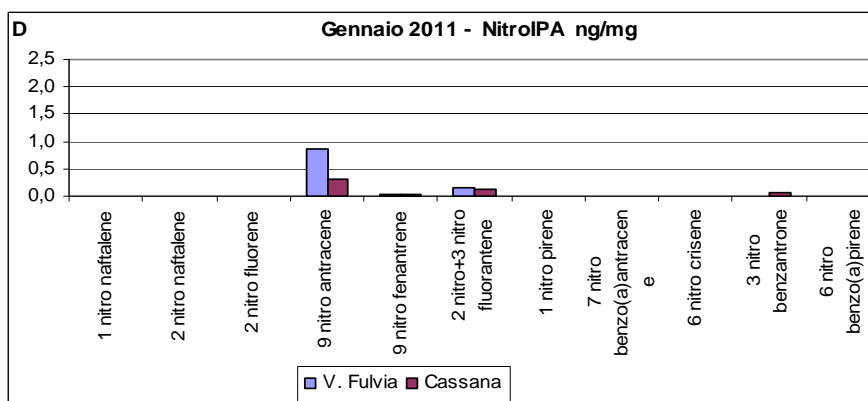
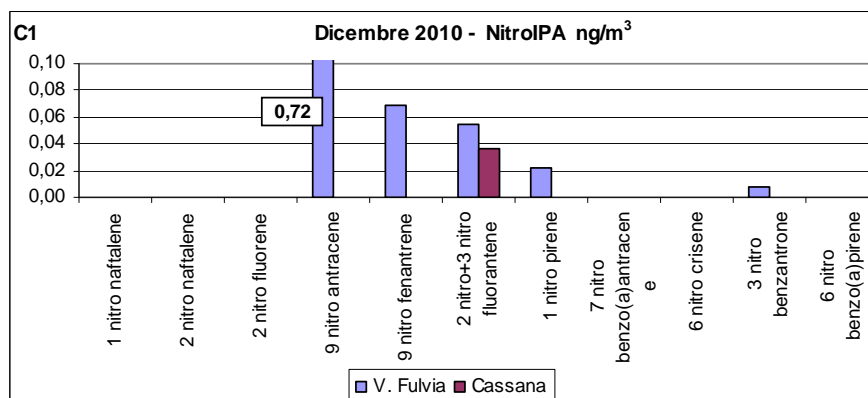
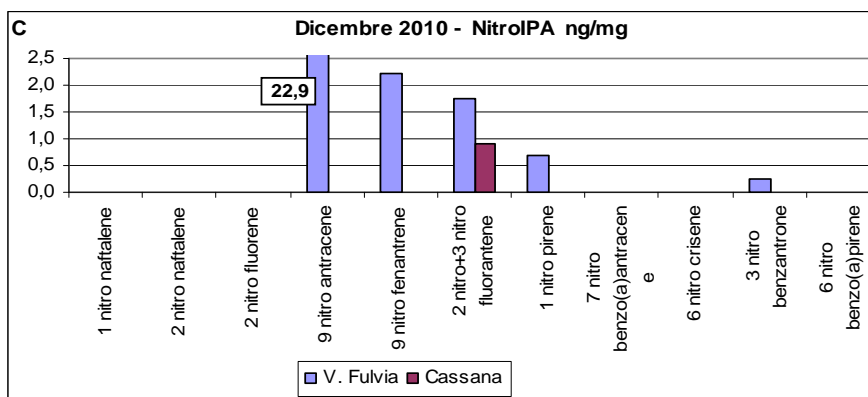
Per quanto riguarda le concentrazioni dei Nitro-IPA sia totali che singoli (Fig.6 e 7), in entrambi i siti, non si osserva la stessa stagionalità evidenziata per gli IPA, infatti, la concentrazione di Nitro-IPA rilevata nel mese di luglio 2010 è maggiore di quella di novembre 2010, gennaio e febbraio 2011 (Fig.6A,B), questo è dovuto ad una concentrazione di 2-nitrofluorene, nel PM di luglio, decisamente più alta rispetto a quella degli altri NitroIPA rilevati (Fig.7A,A1). Si osserva, inoltre, una prevalenza di 9-nitroantracene nel PM prelevato a Villa Fulvia in quasi tutti i mesi monitorati, anche se non in modo statisticamente significativo (ANOVA), questo forse per il numero esiguo di dati (Fig.7B,B1). Da letteratura il 9-nitroantracene è tra i NitroIPA che provengono da emissioni veicolari dirette, soprattutto diesel, mentre il 2-nitrofluorene è un prodotto secondario proveniente da reazioni fotochimiche.

**Figura 6 - Concentrazioni totali dei Nitro-IPA (1-nitronaftalene, 2-nitronaftalene, 2-nitrofluorene, 9-nitroantracene, 9-nitrofenantrene, 2-nitro+3-nitrofluorantene, 1-nitropirene, 7-nitrobenzo(a)antracene, 6-nitrocrisene, 3-nitrobenzantrone, 6-nitrobenzo(a)pirene), determinate negli stessi estratti di particolato atmosferico sottoposti a test di mutagenesi, espresse come ng/mg di particolato (A) e ng/m<sup>3</sup> (B), nei periodi indicati. N.b.: non riportato 2-nitrofluorene da novembre 2010.**

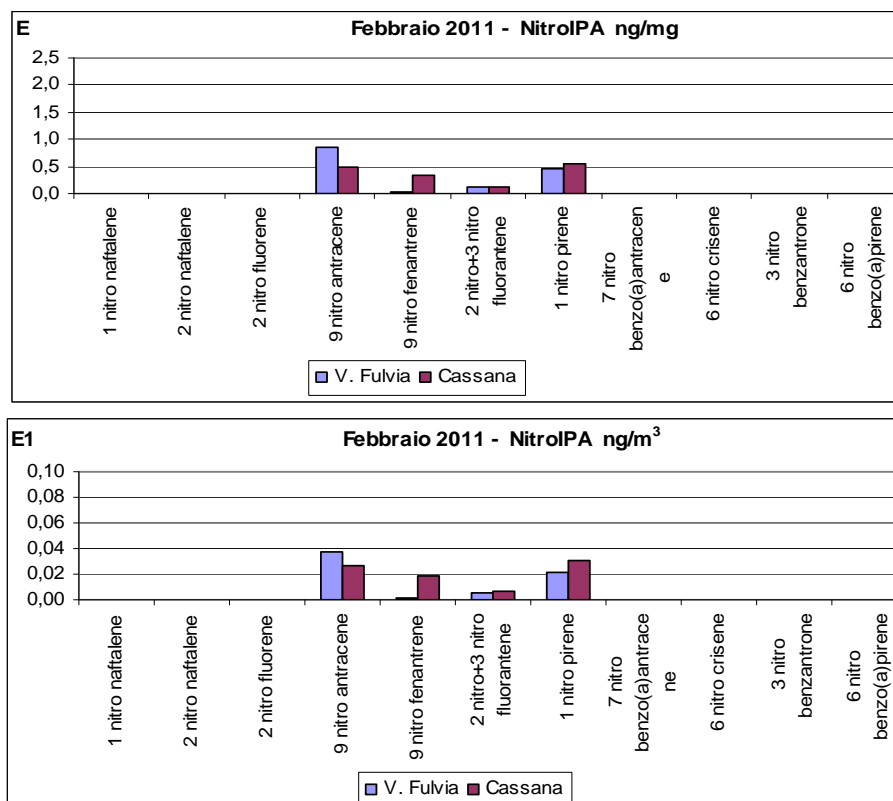


**Figura 7 - Concentrazioni medie mensili dei singoli Nitro-IPA determinate negli stessi estratti di particolato atmosferico sottoposti a test di mutagenesi, espresse come ng/mg di particolato (A,B,C,D,E) e ng/m<sup>3</sup> (A1,B1,C1,D1,E1), nei mesi indicati. N.b.: non riportato 2-nitrofluorene da novembre 2010.**



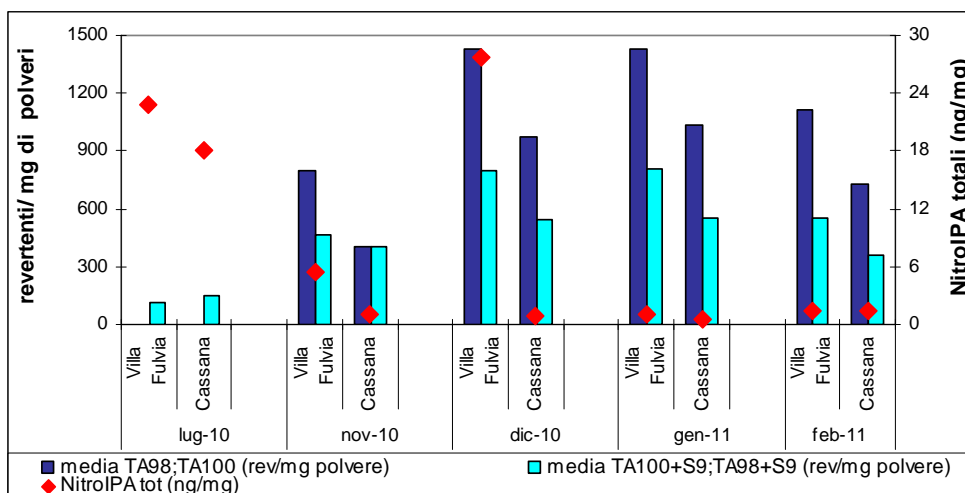






In Figura 8 si riporta il grafico relativo al confronto tra le concentrazioni medie di Nitro-IPA con l'attività mutagenica del particolato, riportata sia come media dei revertenti indotti in assenza di attivazione metabolica che come media dei revertenti ottenuti dai test condotti in presenza di S9. Nel periodo monitorato, eccetto nel mese di dicembre per il PM di Villa Fulvia, non si riscontra corrispondenza tra la maggiore attività mutagenica diretta e la maggiore concentrazione di Nitro-IPA, evidenziando, come riscontrato anche per gli IPA, il contributo di altre sostanze alla mutagenicità del PM campionato nei mesi indicati, sia a Villa Fulvia che a Cassana.

**Figura 8- Comparazione dei livelli di Nitro-IPA (1-nitronaftalene, 2-nitronaftalene, 2-nitrofluorene, 9-nitroantracene, 9-nitrofenantrene, 2-nitro+3-nitrofluorantene, 1-nitropirene, 7-nitrobenzo(a)antracene, 6-nitrocrisene, 3-nitrobenzantrone, 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. N.b.: non riportato 2-nitrofluorene da novembre 2010.**



### Test della cometa

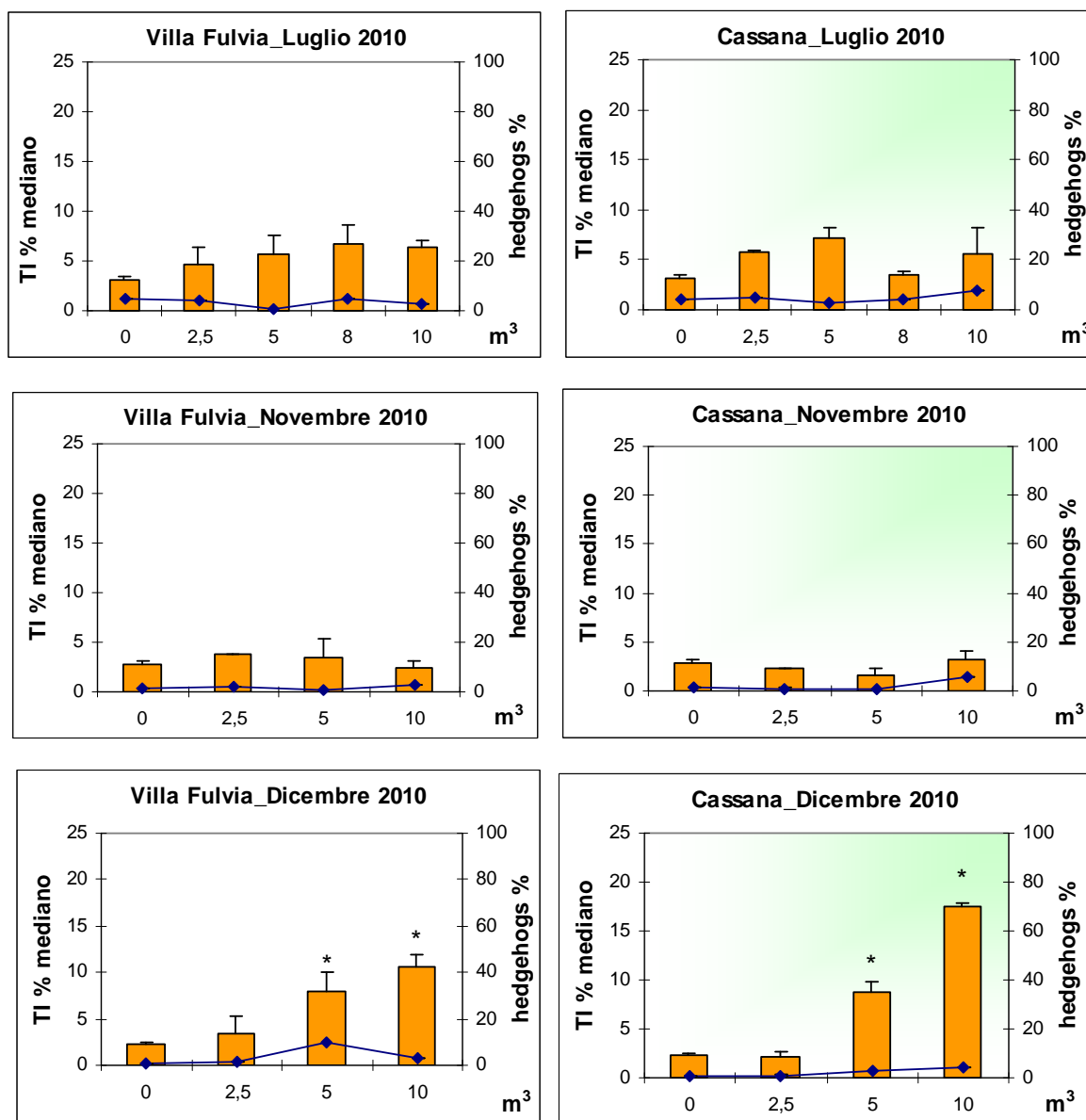
In tutti i campioni non è stato rilevato effetto tossico, inteso sia come vitalità cellulare post incubazione sia come aumento di cellule hedgehogs in fase di lettura (vedi Valutazione e rappresentazione dei dati).

In Figura 9 vengono illustrati i risultati ottenuti su tutti i campioni, 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).

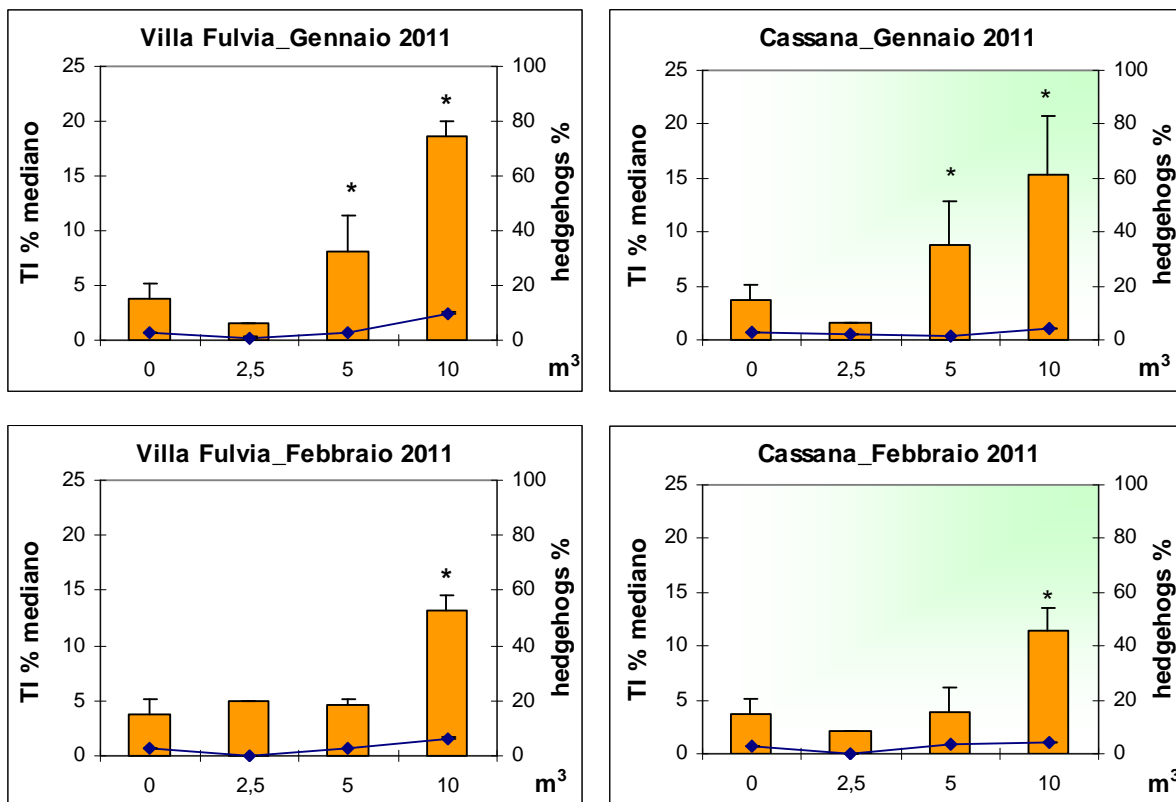
Sono risultati positivi, per entrambi i siti, i campioni prelevati in dicembre 2010, in gennaio e febbraio 2011 (test della mediana  $p < 0.001$ ), mentre i campioni di luglio e novembre 2010 sono risultati negativi, non mostrando un aumento di danno significativo rispetto al proprio controllo, espresso nel grafico come dose 0 (Fig. 9). In Figura 10 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.

I dati non hanno mostrato una differenza nel livello di genotossicità riscontrato nei 2 siti (t di Student).

**Figura 9 - Grafici dose-risposta dei campioni prelevati a Villa Fulvia e a Cassana nei mesi indicati. Vengono riportati per ogni dose il danno al DNA - espresso come percentuale di TI - e della tossicità indotta dal campione - espressa come hedgehogs - (vedi testo).**

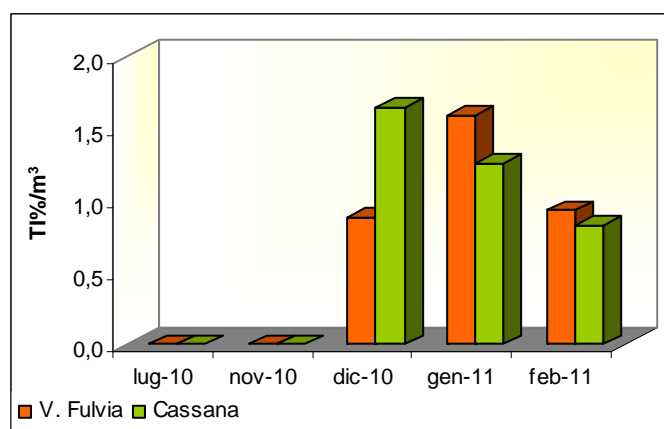


\* positività ottenuta con test della mediana (p < 0,001)



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

**Figura 10 – 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  $R^2$  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 negli anni precedenti 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. Confrontando la mutagenicità (sempre rilevata con i test su Salmonella) dei campioni prelevati nei due siti, 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 i campioni prelevati in entrambi i siti 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", invece, si riscontra una maggiore mutagenicità specifica (revertenti per microgrammo di particolato) nel PM<sub>2,5</sub> prelevato a Villa Fulvia rispetto a quello prelevato a Cassana, dove, tuttavia, si riscontra una concentrazione maggiore di PM (microgrammi di particolato per metro cubo di aria), che fa sì che il numero dei revertenti per metro cubo di aria sia comparabile per i due siti.

I dati sono ancora troppo pochi per poter fare correlazioni tra il numero di revertenti e la concentrazione di IPA, si può tuttavia riscontrare che l'andamento dei due parametri è abbastanza sovrapponibile, soprattutto considerando i test condotti in presenza di attivazione metabolica esogena, che sono quelli più sensibili alla presenza di IPA. Questo suggerisce il contributo di questa classe di contaminanti alla mutagenicità del PM di entrambi i siti di campionamento. Infine si riscontra una maggiore concentrazione di IPA nel PM prelevato a Villa Fulvia rispetto a quello prelevato a Cassana.

Dai dati disponibili 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 mutagena 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, spesso non può essere spiegato con l'analisi chimica attraverso la ricerca di alcune classi di contaminanti, almeno con quelle finora analizzate.

Per quanto riguarda i risultati del Test della Cometa su leucociti umani, non sempre la positività di questi si sovrappone a quella dei test su Salmonella. Infatti i campioni prelevati in novembre 2010 sono risultati entrambi negativi nel test della Cometa e positivi nei test su Salmonella.

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.

Concludendo, da tutti i dati finora raccolti, non si evidenzia un contributo specifico da parte dell'inceneritore di Cassana alla mutagenicità del particolato atmosferico (PM<sub>2,5</sub>) prelevato in quella zona. Si evidenzia, piuttosto un inquinamento diffuso, dovuto, probabilmente, al contributo di più sorgenti.

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**