

Parma, 08 giugno 2011
Prot. n.:

Alla c. a.
Enrica Canossa
e p.c.
Simona Coppi, Claudia Milan
Arpa Emilia-Romagna, Sez.Prov.le di Ferrara

***RETE REGIONALE DI MONITORAGGIO DELLA
MUTAGENICITA' DEL PARTICOLATO ATMOSFERICO
URBANO:
FERRARA anno 2010***

INTRODUZIONE

Il monitoraggio della mutagenicità del particolato atmosferico urbano, frazione PM_{2,5} (particelle con diametro aerodinamico $\leq 2,5 \mu\text{m}$), iniziato a Ferrara nel marzo del 2003, per quel che riguarda la centralina di Corso Isonzo, si è concluso nel dicembre 2007 ed è stato ripreso da gennaio 2009 nella centralina di Villa Fulvia. Infatti il campionamento del PM per il monitoraggio della mutagenicità a partire dal 2008, è stato modificato in tutta la rete regionale, sia per quanto riguarda il sito che i periodi di campionamento ed ha comportato anche una riduzione del numero delle città da monitorare. Questa scelta deriva dalla possibilità di utilizzare solo alcune tra le stazioni di fondo urbano parco previste nella revisione della rete di monitoraggio della qualità dell'aria, in cui sono stati installati gli analizzatori automatici per la misura del PM_{2,5}. Le centraline di campionamento della nuova rete sono state collocate in siti definiti come “fondo urbano parco” e quindi meglio rappresentativi delle realtà ambientali investigate e più confrontabili perché omogenei fra loro.

In base alla precedente esperienza supportata dalla serie storica dei dati, i mesi in cui effettuare il campionamento di PM_{2,5}, da sottoporre a test di mutagenesi, a partire dal 2008, sono: Gennaio, Febbraio, Luglio, Novembre e Dicembre.

Per determinare l'attività mutagena del PM vengono utilizzati due test, entrambi ampiamente utilizzati in campo ambientale, che evidenziano differenti tipi di danno al DNA: il test su Salmonella che rileva mutazioni puntiformi, eseguito su tutti i campioni e il test della Cometa in leucociti umani, che evidenzia rotture al DNA e che viene eseguito sui campioni prelevati nei mesi di gennaio, luglio e novembre.

Dal momento che è cambiato il sito di campionamento di PM non è possibile effettuare confronti con i periodi antecedenti il 2009.

Si riportano di seguito i risultati aggiornati al 2010.

MATERIALI E METODI

Campionamento ed estrazione 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 e il 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 campionatore è collocato nella cabina di monitoraggio della qualità dell'aria situata in Villa Fulvia.

Il campione mensile, formato dall'insieme dei filtri giornalieri, viene estratto tramite apparato Soxhlet, in acetone (Acetone RS per pesticidi). Il solvente viene evaporato mediante rotavapor ed il residuo secco è 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.

Le attività di campionamento e di invio dei filtri mensili alla Sezione di Parma vengono effettuate dal personale della Sezione di Ferrara.

Determinazione Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) e Nitro-IPA

La determinazione degli IPA e dei Nitro-IPA viene 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 ($\text{PM}_{2,5}$) 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 toluene/diclorometano 80:20.

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^+) e ai picchi isotopici ($\text{Mi}+1^+$).

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 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. **I dati relativi al 2-nitrofluorene, a partire da novembre 2010, non sono stati elaborati in quanto il composto risulta interferito (probabilmente altri isomeri non ancora identificati).**

Test su Salmonella

Gli estratti di particolato atmosferico vengono 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. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat Res 1983; 113: 173-215). 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 si saggiano tre concentrazioni e per ogni concentrazione si eseguono tre repliche indipendenti. I revertenti vengono contati dopo 48 ore di incubazione delle piastre in termostato a +37°C.

Test della cometa

Il Test della Cometa, o Comet assay, evidenzia rotture a singolo e doppio filamento del DNA, rilevando 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 di donatori sani vengono incubati con concentrazioni scalari di particolato atmosferico per 1 ora a +37°C. Dopo l'incubazione le cellule vengono lisate e il DNA, su vetrino, viene sottoposto a corsa elettroforetica in tampone fortemente alcalino (pH>13). I vetrini vengono, quindi, analizzati con microscopio a fluorescenza mediante marcatura del DNA con sostanza visibile agli UV (Bromuro di Etidio). In questa fase il DNA delle singole cellule appare come una cometa dotata di testa e di coda, la cui lunghezza e intensità luminosa è proporzionale alla quantità di DNA migrato nella corsa elettroforetica e quindi al danno subito dalle cellule.

Per ogni campione si saggiano 3 dosi, con due repliche ciascuna. Le dosi saggiate sono, a partire da novembre 2010: 2.5, 5 e 10 m³, mentre da luglio 2009 a luglio 2010, sono state: 2.5, 5, 8 e 10 m³ e prima di luglio 2009: 1.25, 2.5 e 5 m³. La scelta di cambiare le dosi è nata dalla necessità di avvicinarsi alla minima dose efficace non tossica.

Valutazione e rappresentazione dei dati

Test su Salmonella

Per stabilire la positività (mutagenicità) dei campioni di particolato si applica il criterio del raddoppio cioè un campione si considera positivo quando il rapporto tra il numero dei revertenti indotti e il numero dei revertenti spontanei (controllo negativo) è ≥ 2 (Chu KL, Patel KM, Lin

AH, Tarone RE, Linhart MS, Dunkel VC. Evaluating statistical analysis and reproducibility of mutagenicity assay. *Mutat Res* 1981; 85: 119-132).

Per l'analisi quantitativa si ricava il valore dei revertenti/m³ di aria e dei revertenti/μg di polveri dal coefficiente angolare della retta di regressione, ottenuta dal numero di revertenti riscontrati in ciascuna delle piastre per ogni dose (m³ 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, 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 intensità percentuale di fluorescenza nella coda della cometa (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) eccetto il mese di gennaio in cui sono state esaminate 100 cellule per ogni dose (50 per replica).

Il potenziale effetto tossico degli estratti è valutato subito dopo il trattamento come riduzione della vitalità cellulare (mortalità), utilizzando il metodo Hoechst/bromuro di etidio: una dose viene definita tossica quando la mortalità cellulare supera il 30%; in questo caso non ne viene quantificata la genotossicità.

Inoltre, durante la fase di lettura, viene valutata la percentuale di cellule "hedgehogs" (porcospino) ovvero cellule fortemente danneggiate che presentano nuclei completamente dispersi, in cui la coda è separata dalla testa della cometa; fra queste possono anche essere presenti cellule che hanno attivato processi di "morte programmata" (apoptosi).

La positività di un campione viene definita mediante il test della mediana condotto con pacchetto statistico SPSS 14, 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 $R^2 \geq 0,60$.

L'estrazione dei campioni, l'esecuzione dei test di mutagenesi, l'elaborazione dei dati e la stesura del report sono effettuate presso la Sezione di Parma, nell'ambito delle attività del Laboratorio Tematico Mutagenesi Ambientale.

RISULTATI

Test su *Salmonella*

La mutagenicità del particolato atmosferico, espressa come Fattore di Genotossicità totale, nel 2010 (Tab.1), presenta, analogamente all'anno precedente, valori "fortemente positivi" in tutti i mesi invernali e autunnali. Il campione di luglio è risultato negativo confermando il tipico andamento stagionale della mutagenicità del PM rilevata con questo tipo di test.

Tabella 1 - Genotossicità del particolato atmosferico urbano PM_{2,5} rilevata come Fattore di Genotossicità (FG) su tutti i test in *Salmonella typhimurium*.

	FG		FG
gen-09	39,3	gen-10	44,8
feb-09	56,1	feb-10	39,8
lug-09	0,7	lug-10	0,4
nov-09	29,1	nov-10	16,1
dic-09	47,1	dic-10	33,3

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

Intervalli di positività del Fattore di Genotossicità calcolato in base a tutti i test eseguiti sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* con e senza attivazione metabolica esogena.

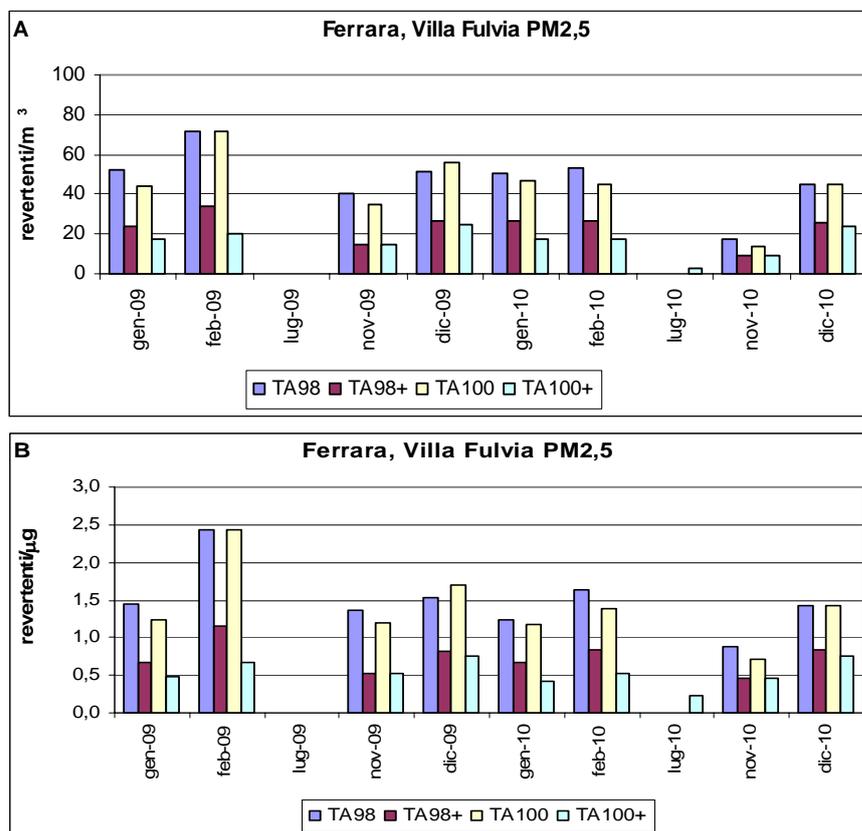
Per quanto riguarda l'aspetto "qualitativo" della mutagenicità (es.: induzione di mutazioni per sostituzione piuttosto che per inserzione o delezione di basi, presenza di mutageni diretti o di promutageni), si osserva una maggiore sensibilità nei test condotti in assenza di attivazione metabolica in entrambi i ceppi, evidenziando una prevalenza di sostanze ad azione mutagena diretta (Fig.1A,B; Tab.2).

Febbraio 2009 si conferma il mese che mostra una maggiore mutagenicit , nella maggior parte dei test (Fig.1A,B, Tab.2).

Tabella 2 - Valori dei revertenti/m³ e dei revertenti/μg di polveri (PM_{2,5}) 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 periodi indicati.

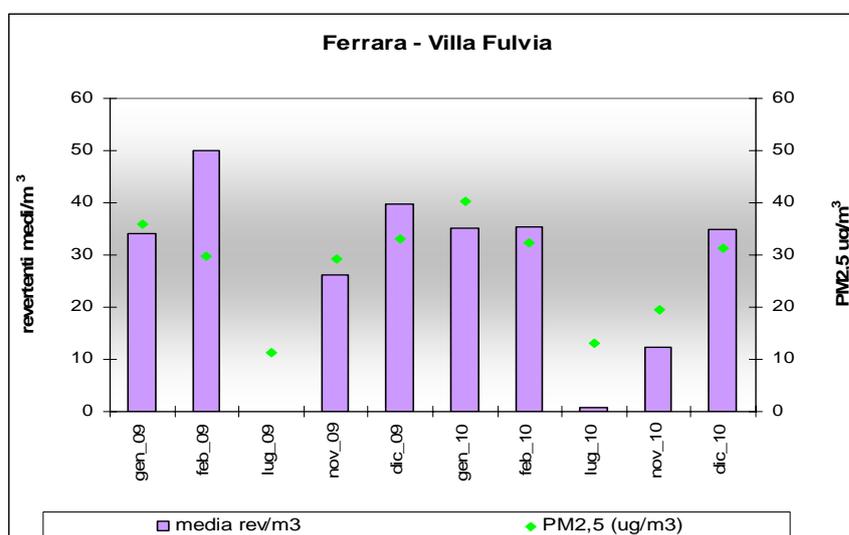
PM _{2,5}	revertenti/m ³				PM _{2,5}	revertenti/μg			
	TA98	TA98+	TA100	TA100+		TA98	TA98+	TA100	TA100+
gen-09	52	24	44	17	gen-09	1,452	0,670	1,229	0,475
feb-09	72	34	72	20	feb-09	2,428	1,146	2,428	0,674
lug-09	0	0	0	0	lug-09	0,000	0,000	0,000	0,000
nov-09	40	15	35	15	nov-09	1,374	0,515	1,202	0,515
dic-09	51	27	56	25	dic-09	1,539	0,815	1,690	0,755
gen-10	50	27	47	17	gen-10	1,245	0,672	1,170	0,423
feb-10	53	27	45	17	feb-10	1,643	0,837	1,395	0,527
lug-10	0	0	0	3	lug-10	0,000	0,000	0,000	0,229
nov-10	17	9	14	9	nov-10	0,875	0,463	0,721	0,463
dic-10	45	26	45	24	dic-10	1,434	0,829	1,434	0,765

Figura 1 - Genotossicit  del PM_{2,5} espressa come revertenti/m³ aria (A) e revertenti/μg polveri (B) in *Salmonella typhimurium* ceppi TA98 e TA100 con (+) e senza (-) attivazione metabolica esogena, nei periodi indicati.



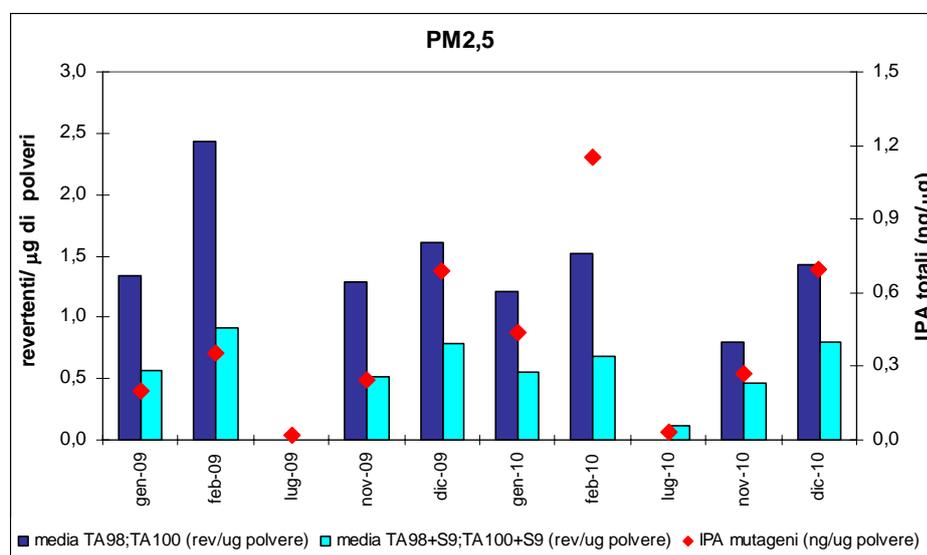
Comparando l'evoluzione temporale della mutagenicità del particolato atmosferico, espressa come media dei revertenti/m³, con l'andamento delle concentrazioni medie mensili (µg/m³) delle polveri (Fig.2), si può constatare che, in linea di massima, l'andamento è confrontabile ed esiste una buona correlazione tra concentrazione di particolato (PM_{2,5}) e il numero di revertenti indotti per m³ di aria ($R^2 = 0,8$).

Figura 2 - Andamenti comparati della mutagenicità del particolato atmosferico urbano, PM_{2,5}, espressa come media dei revertenti/m³ indotti da estratti di campioni mensili, e delle concentrazioni (medie mensili) delle polveri, nei periodi indicati.



Confrontando 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 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, sensibili alla presenza di IPA (Fig. 3), si nota che le concentrazioni di IPA possono in parte giustificare la maggiore attività mutagenica del PM dei mesi più freddi, ma è altresì evidente che non c'è corrispondenza esatta tra la concentrazione più alta di IPA e i valori più alti di revertenti indotti.

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, espresse sia come ng/mg (Fig. 4A, 5A) che come ng/m³ (Fig. 4B, 5B). I periodi dove si riscontrano le concentrazioni maggiori di IPA totali sono quelli più freddi e il mese dove si riscontra la concentrazione maggiore in assoluto è febbraio.

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/m³ (B), nei mesi indicati dell'anno 2010.

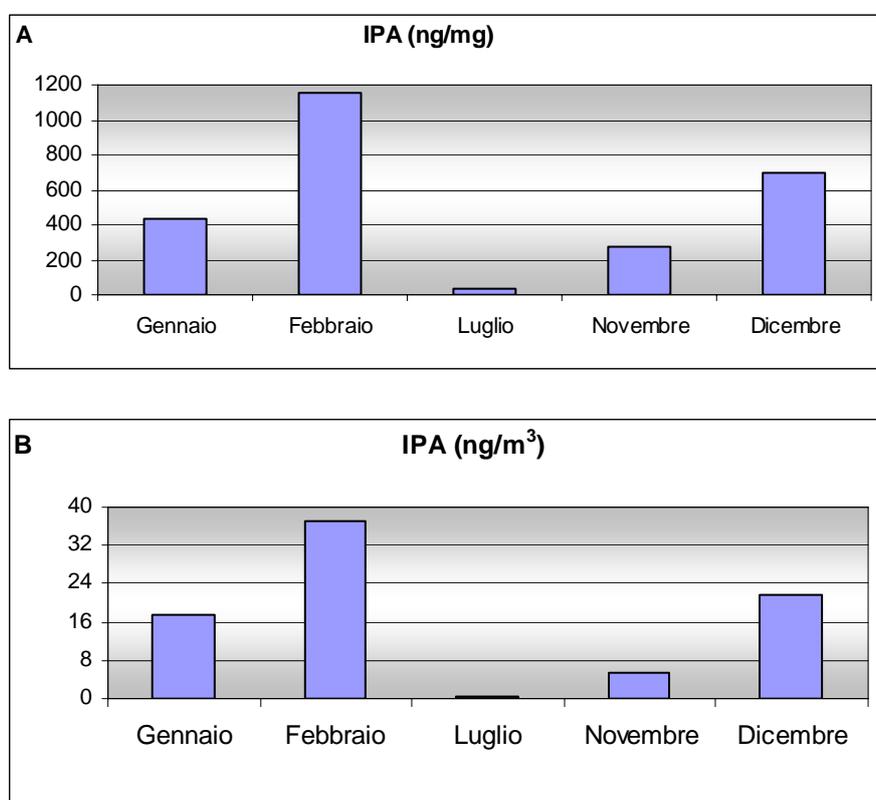
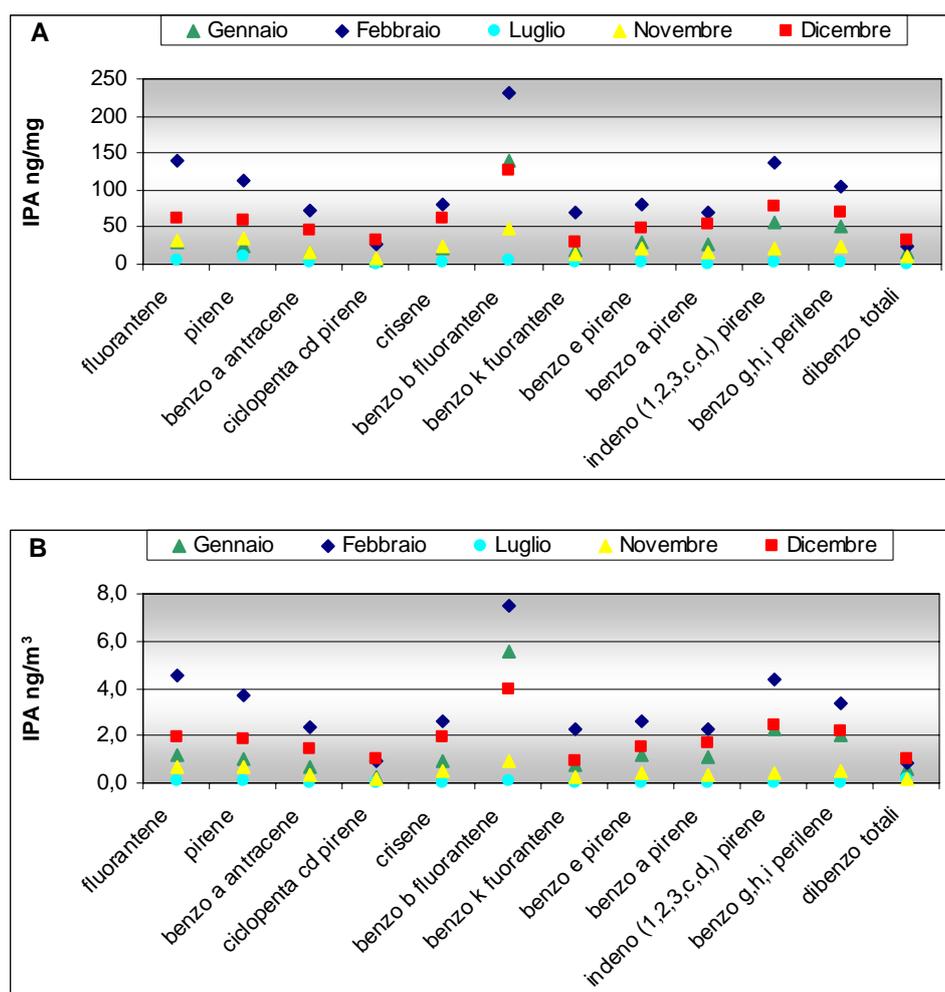


Figura 5 - Concentrazioni medie mensili dei singoli IPA dotati di attività biologica determinate negli stessi estratti di particolato atmosferico sottoposti a test di mutagenesi, espresse come ng/mg di particolato (A) e ng/m³ (B), nei mesi indicati dell'anno 2010.

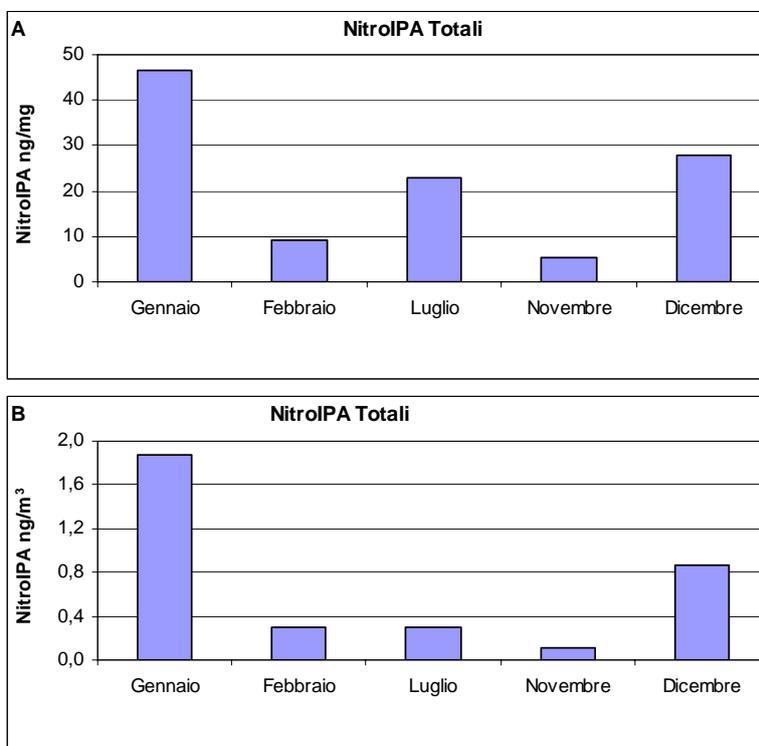
Dibenzo totali = Σ dibenzo (a,h+a,c) antracene, dibenzo (a,l) pirene, dibenzo (a,e) fluorantene, dibenzo (a,e) pirene, dibenzo (a,i) pirene, dibenzo (a,h) pirene.



Soprattutto nei mesi di gennaio, febbraio e dicembre si osserva una prevalenza di benzo(b)fluorantene.

Per quanto riguarda le concentrazioni dei Nitro-IPA sia totali che singoli, espresse come ng/mg di particolato (Fig. 6A, 7A), non si osserva la stessa stagionalità evidenziata per gli IPA, almeno per quanto riguarda il periodo estivo, infatti, la concentrazione di Nitro-IPA rilevata nel mese di luglio è maggiore di quella dei mesi di febbraio e novembre. L'andamento della concentrazione espressa come ng/m³ di aria (Fig. 6B) evidenzia la concentrazione maggiore di Nitro-IPA totali in gennaio mentre non si riscontrano differenze sostanziali tra febbraio, luglio e novembre. Questo può essere dovuto, oltre che alla maggiore presenza di Nitro-IPA, in termini di nanogrammi per milligrammo, nel PM di gennaio rispetto a quella degli altri mesi monitorati, anche alla maggiore concentrazione di PM (µg/m³) (Fig. 2) in questo mese.

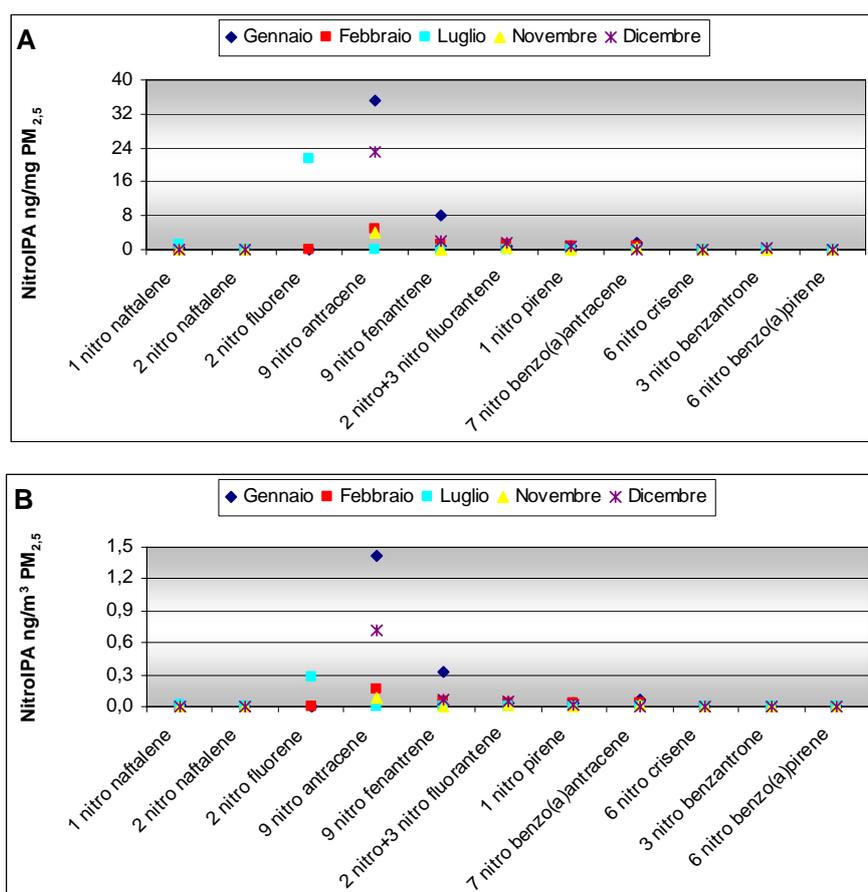
Figura 6- Concentrazioni totali dei Nitro-IPA (1-nitronaftalene, 2-nitronaftalene, 2-nitrofluorene, 9-nitroantracene, 9-nitrofenantrene, 2-nitro+3-nitrofluorantene, 1-nitropirene, 7-nitrobenzo(a)antracene, 6-nitrocrisene, 3-nitrobenzantrone, 6-nitrobenzo(a)pirene), determinate negli stessi estratti di particolato atmosferico sottoposti a test di mutagenesi, espresse come ng/mg di particolato (A) e ng/m³ (B), nei periodi indicati dell'anno 2010.



n.b.: non conteggiato 2-nitrofluorene di novembre e dicembre.

Dalle concentrazioni medie mensili dei singoli Nitro-IPA, espresse sia come ng/mg che come ng/m³ (Fig.7A,B), si nota nel PM_{2,5} di gennaio e di dicembre una concentrazione di 9-nitroantracene più alta rispetto a quella rilevata per gli altri Nitro-IPA, mentre il 2-nitrofluorene è il composto prevalente, soprattutto in termini di ng/mg, nel mese di luglio (Fig.7A). 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. Per i mesi di novembre e dicembre non è stato riportato il dato del 2-nitrofluorene.

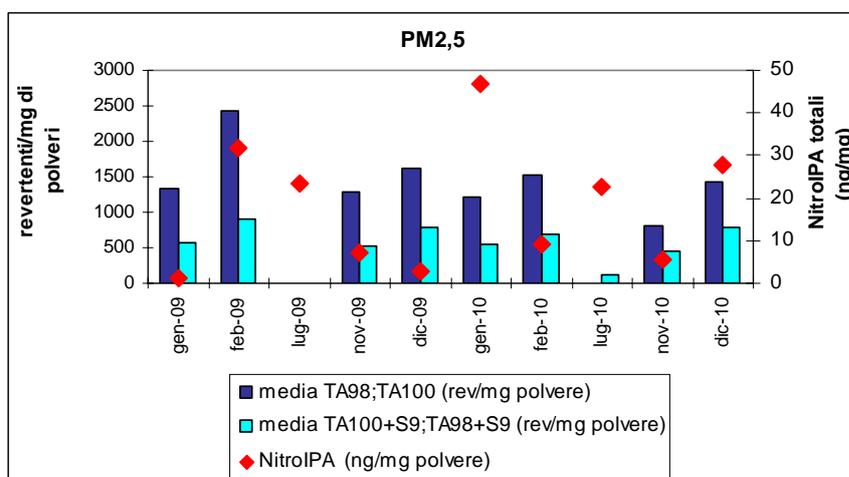
Figura 7 - Concentrazioni medie mensili dei singoli Nitro-IPA determinate negli stessi estratti di particolato atmosferico sottoposti a test di mutagenesi, espresse come ng/mg di particolato (A) e ng/m³ (B), nei mesi indicati dell'anno 2010.



n.b.: non riportato 2-nitrofluorene di novembre e dicembre.

In Figura 8 si riporta il grafico relativo al confronto tra le concentrazioni medie di Nitro-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. Non si riscontra corrispondenza tra la maggiore attività mutagena diretta con 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 a "Villa Fulvia". Si sottolinea che, a partire da luglio 2009, è stato inserito nell'elenco dei Nitro-IPA rilevati, anche il 9-nitrofenantrene.

Figura 8- Comparazione dei livelli di Nitro-IPA (1-nitronaftalene, 2-nitronaftalene, 2-nitrofluorene, 9-nitroantracene, 9-nitrofenantrene (da luglio 2009), 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.

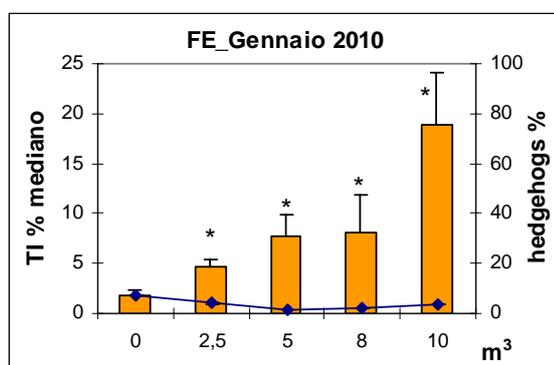


n.b.: non conteggiato 2-nitrofluorene di novembre e dicembre.

Test della cometa

In Figura 9 vengono illustrati i risultati ottenuti dai 3 campioni analizzati nel 2010: per ogni dose saggiata sono riportati sia i valori della percentuale dell'intensità di fluorescenza del DNA della coda della cometa (TI%), che la misura delle cellule particolarmente danneggiate espressa come percentuale di cellule che hanno perso la configurazione da cometa e appaiono come "hedgehogs" (porcospini).

Il campione di gennaio ha mostrato effetto genotossico (test della mediana $p < 0.001$), mentre i campioni di luglio e novembre sono risultati negativi non mostrando un aumento di danno significativo rispetto al proprio controllo, espresso nel grafico come dose 0 (Fig.9). Non si osserva in nessun campione la presenza di effetto tossico (né come mortalità né come "hedgehogs").



* positività ottenuta con test della mediana ($p < 0.001$)

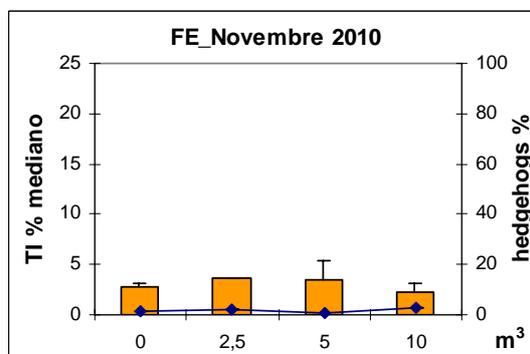
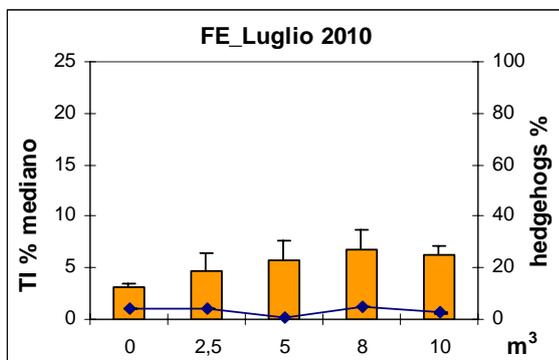
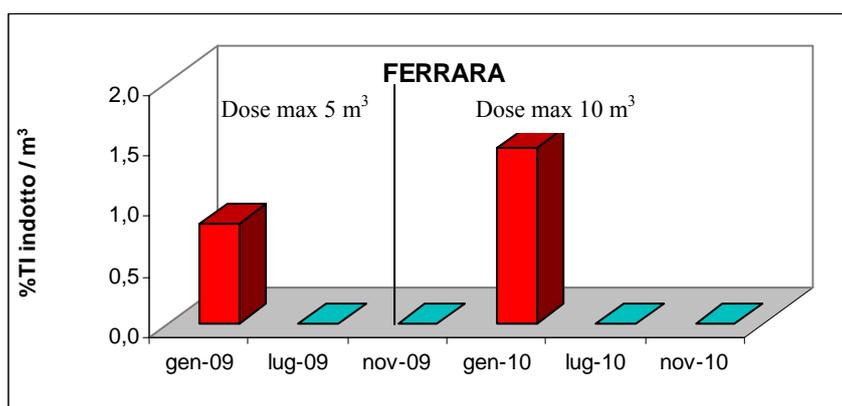


Figura 9 – Grafici dose-risposta dei campioni analizzati nel 2010. Vengono riportati, per ogni dose, i valori percentuali del danno al DNA - espresso come percentuale di TI - e della tossicità indotta dal campione - espressa come hedgehogs - (vedi testo).

In Figura 10 sono riassunti in un unico grafico i risultati relativi a tutti i campioni finora analizzati, espressi come i valori dei coefficienti angolari ottenuti dalle curve dose effetto dei campioni positivi e/o con R^2 maggiore o uguale a 0,6. Si ricorda che da luglio 2009 la dose

massima saggiata corrisponde a 10 m^3 , mentre in precedenza la dose massima corrispondeva a 5 m^3 .

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 (le barre rosse indicano i campioni positivi).



CONCLUSIONI

Si ricorda che il campionamento del $\text{PM}_{2,5}$ nel nuovo sito è stato avviato nel 2009 e almeno al momento, non si evidenzia un trend nell'andamento della genotossicità del PM, ma si conferma la stagionalità della mutagenicità, rilevata dai test su Salmonella, già riscontrata negli anni precedenti, con valori più alti nei mesi più freddi e valori più bassi o negativi nel periodo estivo.

Dai dati disponibili relativi al confronto tra IPA ed effetto mutageno, si evince un importante contributo alla mutagenicità del PM anche da parte di altre sostanze, soprattutto ad azione mutagena diretta, cioè che possono agire direttamente sul DNA senza bisogno di essere metabolizzate per esercitare il loro effetto genotossico. Come si può osservare dal confronto tra Nitro-IPA ed effetto mutageno, non si riscontra corrispondenza tra i due andamenti, e questo induce a ipotizzare la presenza nel $\text{PM}_{2,5}$, oltre di questa classe di composti, anche di altre sostanze ad azione mutagena diretta che contribuiscono in modo consistente alla mutagenicità del PM.

Come già sottolineato più volte nei precedenti report, l'effetto biologico delle miscele complesse, quale è il particolato atmosferico, non può essere spiegato attraverso l'analisi chimica di alcune classi di contaminanti.

La risposta al test della Cometa non risulta, almeno nel periodo analizzato, completamente sovrapponibile a quella al test su Salmonella, infatti mentre con quest'ultimo test tutti i campioni prelevati nei mesi di novembre e gennaio sono risultati positivi, con il test della Cometa solo i campioni di gennaio sono risultati positivi. Questo evidenzia la complementarità dei due test. Occorre tenere in considerazione che il campionamento a Villa Fulvia è iniziato da poco tempo e i dati sono ancora troppo pochi per poter fare considerazioni definitive.

Nel monitoraggio della genotossicità del particolato atmosferico urbano, comunque, l'utilizzo di test con end point genetici diversi, oltre al fatto che possono non dare sempre risultati sovrapponibili, 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.

Si ricorda l'indirizzo del sito web del Laboratorio Tematico "Mutagenesi Ambientale" dove sono pubblicati i dati relativi alla mutagenicità del particolato atmosferico urbano campionato a Ferrara e del particolato campionato negli altri nodi della rete regionale:

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

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