



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, 03 aprile 2013

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

***MONITORAGGIO DELLA MUTAGENICITA'***  
***DEL PARTICOLATO ATMOSFERICO URBANO:***  
***FERRARA anno 2012***



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

---

## INTRODUZIONE

Il monitoraggio della mutagenicità del particolato atmosferico (Particulate Matter - PM) urbano, frazione PM<sub>2,5</sub> (particelle con diametro aerodinamico  $\leq 2,5 \mu\text{m}$ ) è iniziato a Ferrara nel marzo del 2003. Il sito di campionamento a Ferrara, dal 2009, è Villa Fulvia e i mesi in cui si effettua il campionamento di PM<sub>2,5</sub>, da sottoporre a test di mutagenesi, sono: gennaio, febbraio, luglio, novembre e dicembre.

Per determinare l'attività mutagena del PM vengono utilizzati due test, entrambi ampiamente usati in campo ambientale, in grado di evidenziare differenti tipi di danno al DNA: il test su Salmonella che rileva mutazioni puntiformi, eseguito su tutti i campioni e il test della Cometa, o Comet assay, **che a partire dal 2012 viene effettuato su una linea cellulare umana: A549**, costituita da cellule di epitelio alveolare ottenute da carcinoma polmonare umano, anziché su leucociti da sangue periferico di donatori sani come avveniva in precedenza. Il test della Cometa evidenzia rotture a singolo o a doppio filamento del DNA e viene eseguito sui campioni prelevati nei mesi di gennaio, luglio e novembre.

Si riportano di seguito i risultati aggiornati al 2012.

## 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  $1000 \text{ m}^3/\text{ml}$  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 ( $\text{Mi}$ )<sup>+</sup> e ai picchi isotopici ( $\text{Mi}+1$ )<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 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. **Da novembre 2010 sono stati inseriti anche l'1,6-dinitropirene e l'1,8-dinitropirene.**

**I dati relativi al 2-nitrofluorene, a partire da novembre 2010, non sono stati elaborati in quanto il composto risulta interferito (probabilmente da 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 si utilizzano ceppi di batteri recanti differenti mutazioni nel gene codificante per la biosintesi dell'istidina che li rendono incapaci di crescere nel terreno di coltura, in piastra, 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.

Per distinguere le sostanze che per esercitare la loro azione mutagenica 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. Per ogni test (TA98 con, TA98 senza, TA100 con, TA100 senza attivazione metabolica) vengono contati i revertenti dopo 48 ore di incubazione delle piastre in termostato a +37°C.

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

Il Test della Cometa, o Comet assay, evidenzia rotture del DNA a singolo e a doppio filamento, rilevando un danno primario nelle singole cellule non ancora riparato, né fissato.

**Come indicato nell'introduzione, a partire da gennaio 2012, il test della Cometa viene effettuato sulla linea cellulare A549, costituita da cellule di epitelio alveolare ottenute da carcinoma polmonare umano, anziché su leucociti da sangue periferico di donatori come avveniva in precedenza. Pertanto, essendo modificato "l'organismo" utilizzato ma, soprattutto, i tempi di incubazione (24 ore anziché 1 ora), i risultati ottenuti con le A549 non sono confrontabili con quelli precedenti, ottenuti con i leucociti da donatori.**

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 della linea cellulare A549 vengono messe a contatto con concentrazioni scalari di estratto di particolato atmosferico per **24 ore** a +37°C. Dopo l'incubazione le cellule vengono lisate e il DNA 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 (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. Si fa presente che la dose massima saggiata corrisponde a 10 m<sup>3</sup> di aria.

### *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 dal campione e il numero dei revertenti spontanei (controllo negativo)  $\geq 2$  (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/m<sup>3</sup> di aria e dei revertenti/ $\mu$ g di polveri 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  $\mu$ g 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. Si considera, a tal fine, solo il coefficiente angolare delle rette di regressione dose-effetto dei campioni positivi e di quelli che presentano un  $R^2 \geq 0,60$ .

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 percentuale di intensità di fluorescenza del DNA 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 per ogni replica).



Il potenziale effetto tossico degli estratti è valutato subito dopo il trattamento con il campione, come riduzione della vitalità cellulare (mortalità), utilizzando il Trypan blue: un campione viene definito tossico, ad determinata una dose, quando la mortalità cellulare, a quella dose, supera il 30%, in questo caso la genotossicità viene quantificata fino alla dose precedente.

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 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  $R^2 \geq 0,60$ , eliminando le dosi che presentano effetto tossico.

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, anche nel 2012 (Tab.1) presenta valori “fortemente positivi” in tutti i mesi invernali e autunnali. I valori più alti di FG, di tutto il periodo, sono quelli rilevati in dicembre 2011 e in gennaio 2012. La negatività del campione di luglio conferma il tipico andamento stagionale della mutagenicità del PM rilevata con questo tipo di test.

**Tabella 1 - Genotossicità del particolato atmosferico urbano PM<sub>2,5</sub> rilevata come Fattore di Genotossicità (FG) su tutti i test in *Salmonella typhimurium*.**

|        | FG   |        | FG   |        | FG    |        | FG    |
|--------|------|--------|------|--------|-------|--------|-------|
| gen-09 | 39,3 | gen-10 | 44,8 | gen-11 | 39,7  | gen-12 | 104,7 |
| feb-09 | 56,1 | feb-10 | 39,8 | feb-11 | 54    | feb-12 | 53,2  |
| lug-09 | 0,7  | lug-10 | 0,4  | lug-11 | 0,5   | lug-12 | 0,2   |
| nov-09 | 29,1 | nov-10 | 16,1 | nov-11 | 38,2  | nov-12 | 45,4  |
| dic-09 | 47,1 | dic-10 | 33,3 | dic-11 | 108,4 | dic-12 | 92,1  |

| 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), anche nel 2012 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) cioè che possono agire sul DNA direttamente senza essere metabolizzate.

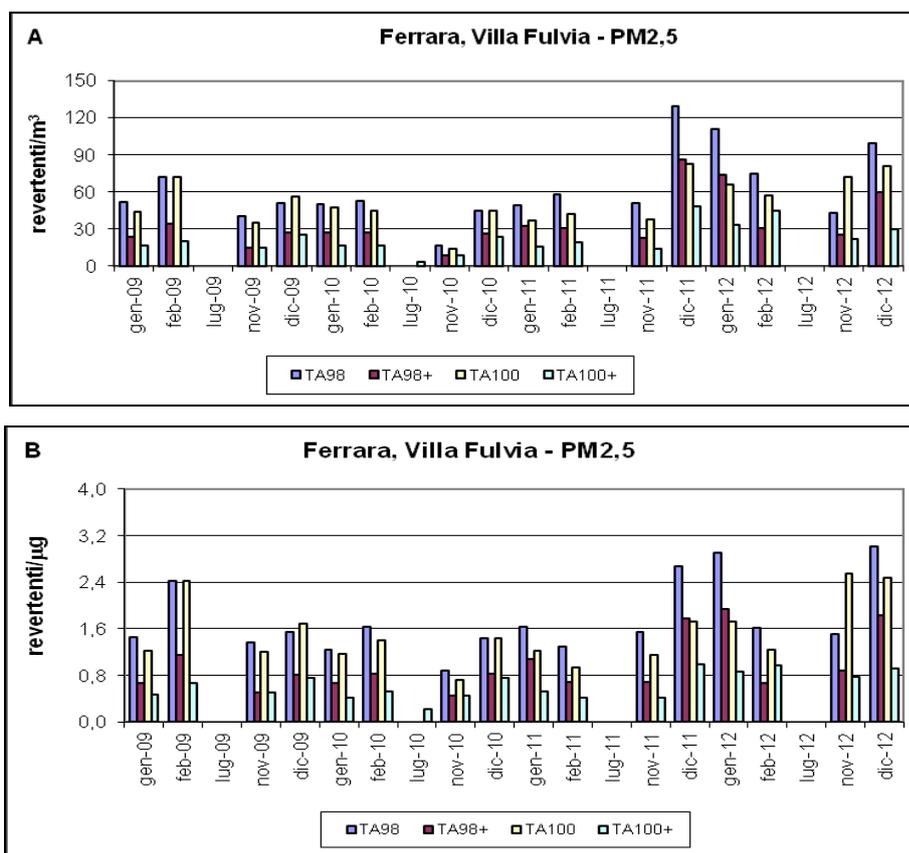
In generale si può constatare che la maggiore mutagenicità del PM, intesa come numero di revertenti indotti per metro cubo di aria (Fig.1A), di certi mesi rispetto ad altri può dipendere sia da una maggiore attività mutagena specifica del particolato atmosferico, cioè dal numero di revertenti indotti per microgrammo di particolato (Fig.1B), che da una maggiore concentrazione dello stesso in atmosfera (Fig.2) e che non sempre i due fattori incidono in egual misura.

Comparando, infatti, l'evoluzione temporale della mutagenicità del particolato atmosferico, espressa come media dei revertenti/m<sup>3</sup>, con l'andamento delle concentrazioni medie mensili (µg/m<sup>3</sup>) delle polveri (Fig.2), si può constatare che, in linea di massima, l'andamento è confrontabile in quanto esiste una discreta correlazione tra i due parametri (R<sup>2</sup> = 0,7). Tuttavia, non sempre ad una maggiore concentrazione di PM corrisponde un numero maggiore di revertenti indotti, sottolineando la rilevanza della tipologia e della quantità delle sostanze mutagene associate al PM.

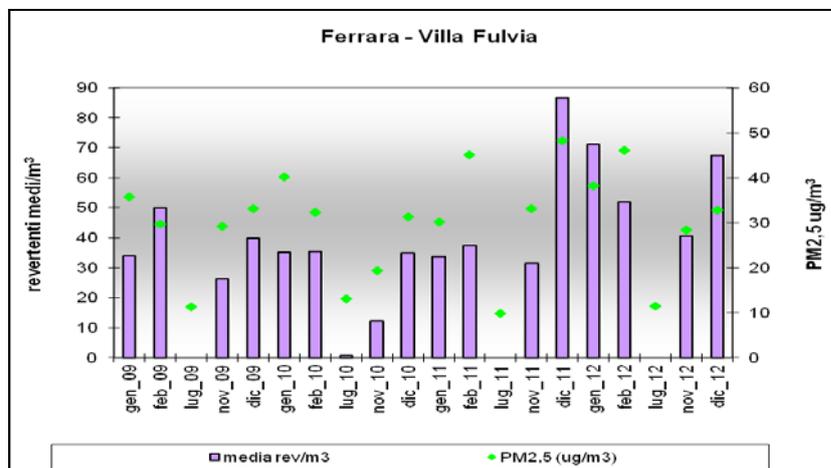
**Tabella 2 - Valori dei revertenti/m<sup>3</sup> e dei revertenti/μg di polveri (PM<sub>2,5</sub>) calcolati dalla retta di regressione dose/effetto, in tutti i test eseguiti sui ceppi TA98 e TA100 di *Salmonella typhimurium* con (+) e senza attivazione metabolica esogena, nei periodi indicati.**

| PM <sub>2,5</sub> | revertenti/m <sup>3</sup> |       |       |        | PM <sub>2,5</sub> | 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  |
| gen-11            | 49                        | 33    | 37    | 16     | gen-11            | 1,627         | 1,083 | 1,229 | 0,531  |
| feb-11            | 58                        | 31    | 42    | 19     | feb-11            | 1,288         | 0,688 | 0,933 | 0,422  |
| lug-11            | 0                         | 0     | 0     | 0      | lug-11            | 0,000         | 0,000 | 0,000 | 0,000  |
| nov-11            | 51                        | 23    | 38    | 14     | nov-11            | 1,542         | 0,695 | 1,149 | 0,423  |
| dic-11            | 129                       | 86    | 83    | 48     | dic-11            | 2,673         | 1,782 | 1,720 | 0,994  |
| gen-12            | 111                       | 74    | 66    | 33     | gen-12            | 2,904         | 1,936 | 1,727 | 0,863  |
| feb-12            | 75                        | 31    | 57    | 45     | feb-12            | 1,627         | 0,672 | 1,236 | 0,976  |
| lug-12            | 0                         | 0     | 0     | 0      | lug-12            | 0,000         | 0,000 | 0,000 | 0,000  |
| nov-12            | 43                        | 25    | 72    | 22     | nov-12            | 1,518         | 0,883 | 2,542 | 0,777  |
| dic-12            | 99                        | 60    | 81    | 30     | dic-12            | 3,021         | 1,831 | 2,471 | 0,915  |

**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 periodi indicati.**

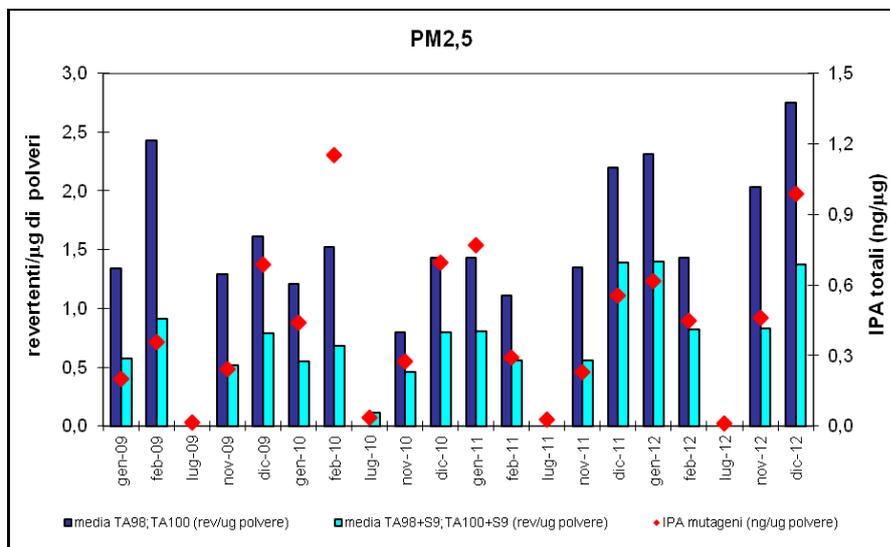


**Figura 2 - Andamenti comparati della mutagenicità del particolato atmosferico urbano, PM<sub>2,5</sub> (medie mensili dei revertenti/m<sup>3</sup>), e delle concentrazioni delle polveri nei periodi indicati.**



Dal confronto tra le concentrazioni mensili degli IPA totali, 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 che come media dei revertenti ottenuti dai test condotti in presenza di S9, sensibili alla presenza di IPA (Fig.3), si conferma che le concentrazioni di IPA possono in parte giustificare la maggiore attività mutagena del PM dei mesi più freddi, avendo lo stesso andamento stagionale, ma è altresì evidente che non sempre c'è corrispondenza tra la concentrazione più alta di IPA e i valori più alti di revertenti indotti ed è evidente un forte contributo alla mutagenicità del PM anche da parte di altre sostanze soprattutto ad azione mutagena diretta.

**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.**

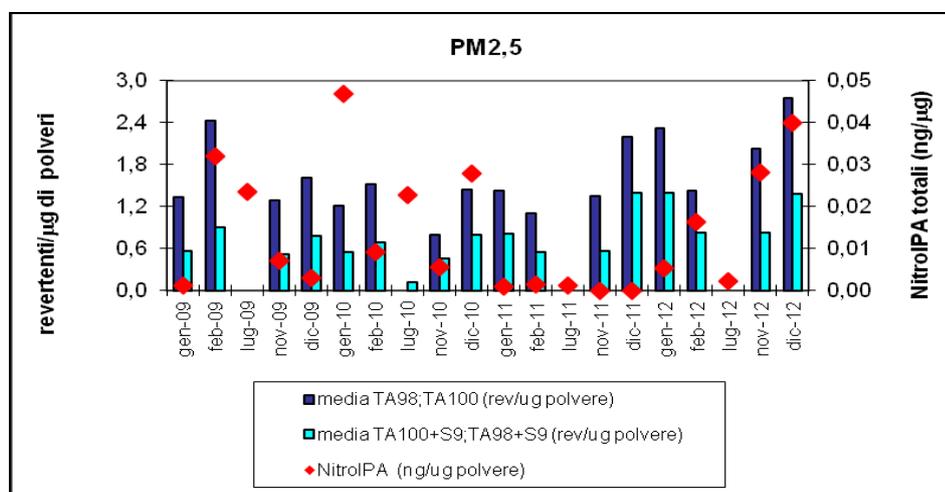


In Figura 4 si riporta il grafico relativo al confronto tra le concentrazioni mensili dei Nitro-IPA totali con l'attività mutagena del particolato, riportata sia come media dei revertenti indotti in assenza di attivazione metabolica che come media dei revertenti ottenuti dai test condotti in presenza di S9.

Non si riscontra corrispondenza tra la maggiore attività mutagenica diretta e la maggiore concentrazione di Nitro-IPA, evidenziando, come già riscontrato anche per gli IPA, il contributo di altre sostanze alla mutagenicità del PM. Inoltre, per quanto riguarda la concentrazione dei Nitro-IPA, non si osserva la stessa stagionalità evidenziata per gli IPA e questo può essere dovuto al fatto che i Nitro-IPA sono anche prodotti secondari degli IPA che si formano in atmosfera in seguito a reazioni fotochimiche.

Si ricorda che da novembre 2010 sono stati inseriti anche l'1,6-dinitropirene e l'1,8-dinitropirene e che i dati relativi al 2-nitrofluorene, a partire da novembre 2010, non sono stati elaborati in quanto il composto risulta interferito.

**Figura 4 - Comparazione dei livelli di Nitro-IPA ( $\Sigma$  1-nitronaftalene, 2-nitronaftalene, 2-nitrofluorene (fino a luglio 2010), 9-nitroantracene, 9-nitrofenantrene (da luglio 2009), 2-nitro+3-nitrofluorantene, 1-nitropirene, 7-nitrobenzo(a)antracene, 6-nitrocrisene, 3-nitrobenzantrone, 1,6-dinitropirene (da novembre 2010), 1,8-dinitropirene (da novembre 2010), 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.**



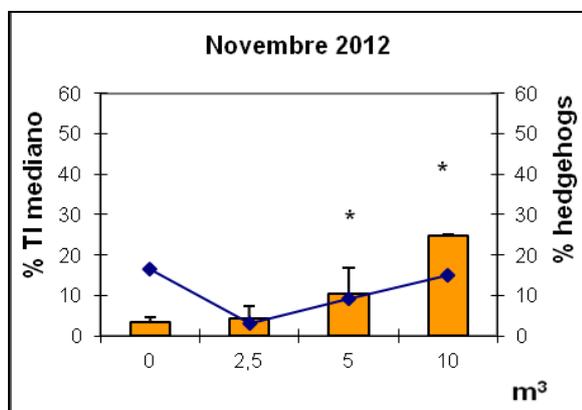
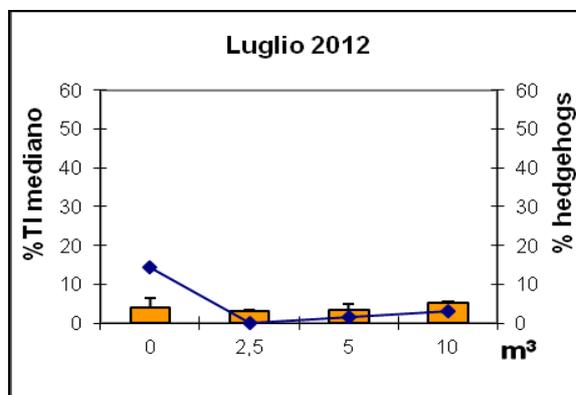
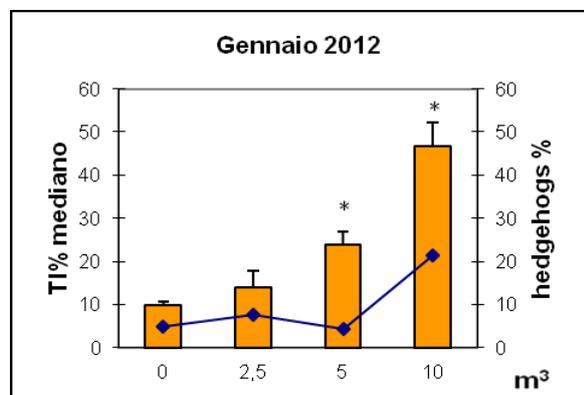
### Test della cometa

In Figura 5 vengono illustrati i risultati ottenuti dai tre campioni analizzati nel 2012: per ogni dose saggiata sono riportati sia i valori della percentuale dell'intensità di fluorescenza del DNA nella coda della cometa (TI%) che la percentuale delle cellule che, in quanto particolarmente danneggiate, hanno perso la configurazione a cometa e appaiono come "hedgehogs" (porcospini). I campioni di gennaio e novembre hanno mostrato effetto genotossico sulle cellule A549 evidenziando in questi due mesi la presenza, nel PM<sub>2,5</sub> campionato a Villa Fulvia, di sostanze in

grado di indurre rotture a singolo e/o a doppio filamento nel DNA. Il campione di luglio, invece, è risultato negativo in questo test. In nessun campione si osserva la presenza di effetto tossico sulle cellule subito dopo il trattamento con il campione e solo il campione di gennaio, durante la lettura, ha mostrato un aumento della percentuale di hedgehogs all'ultima dose.

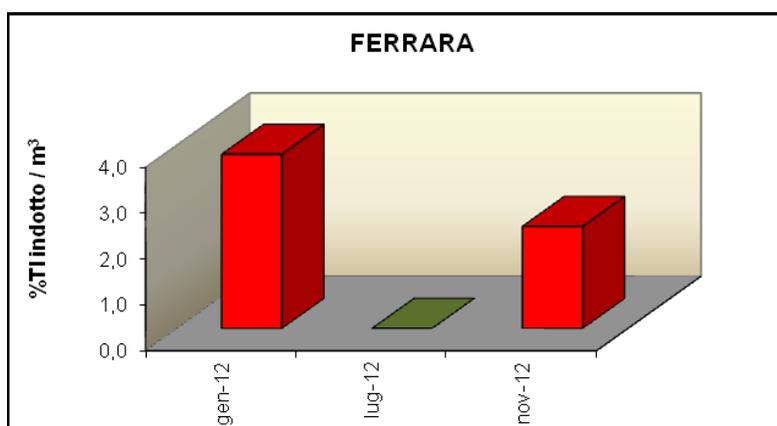
Si ricorda che, essendo modificato "l'organismo" utilizzato ma, soprattutto, i tempi di incubazione (24 ore anziché 1 ora), i risultati ottenuti con le A549 non sono confrontabili con quelli precedenti, ottenuti con i leucociti di donatori sani. Dal momento che i dati ottenuti con la linea cellulare A549, sono pochi, non sono stati effettuati confronti e correlazioni con la concentrazione delle polveri, con quella degli IPA e dei Nitro-IPA rilevati negli stessi estratti sottoposti al test della Cometa.

**Figura 5 – Grafici dose-risposta dei campioni analizzati nel 2012. Vengono riportati, per ogni dose, la media dei valori del 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 = 0.000)

**Figura 6 – 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 (le barre rosse indicano i campioni positivi).**



## CONCLUSIONI

Si conferma la stagionalità della mutagenicità rilevata dai test con Salmonella, già riscontrata negli anni precedenti, con valori più alti nei mesi più freddi e valori più bassi o negativi nel periodo estivo, con valori di mutagenicità più elevati, nella maggior parte dei test su Salmonella, nei mesi di dicembre 2011 e gennaio 2012.

Questa stagionalità si riscontra anche nella genotossicità evidenziata con il test della Cometa sulla linea cellulare umana A549. I dati ottenuti col test della Cometa sono relativi solo a tre mesi e pertanto troppo pochi per poter fare considerazioni più approfondite.

Dai dati disponibili relativi al confronto tra IPA e attività mutagena del particolato, rilevata con i test su Salmonella, pur essendo evidente la stessa stagionalità, non si evidenzia corrispondenza nell'andamento dei due parametri e si conferma la discrepanza tra le concentrazioni più alte di IPA e i valori più alti di revertenti indotti. Si conferma anche che il maggior contributo alla mutagenicità del PM è dato da sostanze ad azione mutagena diretta, cioè sostanze che possono agire direttamente sul DNA, ma che per lo più non appartengono ai derivati degli IPA rilevati. Questo lo si evidenzia dalla mancata corrispondenza tra la maggiore attività mutagena diretta e la



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

maggior concentrazione di Nitro-IPA rilevati nel periodo considerato. Come già sottolineato più volte nei precedenti report, l'effetto biologico delle miscele complesse, quale è il particolato atmosferico, non può essere spiegato unicamente con l'una o con l'altra classe di contaminanti, almeno di quelle finora analizzate.

Dai test su Salmonella, si conferma che la maggior mutagenicità del PM intesa come numero di revertenti indotti per metro cubo di aria in certi periodi può dipendere sia da una maggior attività mutagena specifica del particolato atmosferico, che da una maggior concentrazione dello stesso in atmosfera, ma che non sempre i due fattori incidono in egual misura, sottolineando la rilevanza della tipologia e della quantità delle sostanze mutagene associate al PM.

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.

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**

*Firmato digitalmente*